

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Kathryn Ana Bortolini Simão da Silva**

**EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DE  
TRITERPENOS PENTACÍCLICOS EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE HIPERALGESIA CRÔNICA:  
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CANABINÓIDE**

**Florianópolis  
2011**



**Kathryn Ana Bortolini Simão da Silva**

**EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DE  
TRITERPENOS PENTACÍCLICOS EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE HIPERALGESIA CRÔNICA:  
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA CANABINÓIDE**

Tese submetida ao curso de Pós-Graduação  
em Farmacologia do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutora em  
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Co-Orientador: Prof. Dra. Flávia Carla Meotti

Florianópolis  
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S586e Silva, Kathryn Ana Bortolini Simão da  
Efeito anti-hiperalgésico e antiinflamatório de triterpenos  
pentacíclicos em modelos experimentais de hiperalgesia  
crônica [tese] : participação do sistema canabinóide / Kathryn  
Ana Bortolini Simão da Silva ; orientador, João Batista  
Calixto. - Florianópolis, SC; 2011.  
119 p.: il., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Canabinóides. 3. Inflamação. 4.  
Hiperalgesia. 5. Triterpenos. I. Calixto, João Batista. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

"Efeito anti-hiperalgésico e anti-inflamatório de triterpenos pentacíclicos em modelos experimentais de hiperalgesia crônica: participação do sistema canabinóide".

Kathryn Ana Bortolini Simão da Silva

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

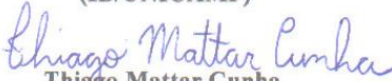
  
João Bstista Calixto  
Presidente (FMC/UFSC)

  
Flávia Carla Meotti  
Co-Orientadora (FMC/UFSC)

  
Giles Alexander Rae  
(FMC/UFSC)

  
Reinaldo Takahashi  
(FMC/UFSC)

  
Carlos Amilcar Parada  
(IB/UNICAMP)

  
Thiago Mattar Cunha  
(FMRP/USP)

Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 21 de Março de 2011.

**O tempo é o melhor autor.  
Sempre encontra um final  
perfeito**

**Charles Chaplin**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me guiar no caminho do bem. Sem a fé, muitas vezes falha, e sem ele este momento não seria possível.

A minha mãe, que desde a infância me incentivou a trilhar os caminhos da ciência, mesmo quando parecia impossível. Muito obrigada pelo seu amor e apoio.

Ao meu querido e amado marido, Eduardo, pela paciência, ombro amigo, dedicação, amor e por sempre me apoiar em minhas decisões. Amo você!

Aos meus sogros, Mercedes e Ailton, que sempre me incentivaram a seguir os caminhos dos estudos. Muito obrigada pelo apoio sempre.

Ao meu orientador, Professor Calixto, meu especial agradecimento por ter dado o privilégio de sua orientação. Agradeço também pela oportunidade de aprender muito além do que consta neste trabalho, e principalmente pela oportunidade de participar do projeto “Jovens Talentos”. São ensinamentos que levarei sempre comigo.

A minha co-orientadora, Flávia, pelos ensinamentos, “puxões de orelha” e correções da tese. Com certeza essa convivência me tornará uma profissional muito mais crítica. Muito obrigada!!

A minha grande amiga, “Gigika”. Você me ensinou a ser perseverante nos caminhos escolhidos e me fez acreditar em minhas capacidades. Você soube estar sempre presente, apesar da distância. Irei cultivar nossa amizade para sempre.

A minha amiga e companheira, Ana Flávia, por todo seu apoio dentro e fora do laboratório. Continuaremos nossa jornada...

As minhas amigas Ali, Ju e Paty por sempre estarem presentes, compartilhando os momentos de alegria e dando “aquela” força nas horas difíceis. Vou sentir saudades das nossas “pizzas”.

Aos colegas de pesquisa Allisson, Rafaela, Rodrigo, Rafael, Maíra, Geci, Lizi, Raquel, Fabi, Israel, Stefânia, Edinéia, Cláudia, Juliana Chaves, Juliana Fabris, Mari, Robson, Jarbas e demais colegas de outros laboratórios pela amizade e troca de experiências.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelos ensinamentos e companherismo ao longo destes 4 anos. Em especial aos professores Giles e José Eduardo por fazerem parte da minha vida científica, desde o início. Á Diana, Rita, Pedro e “Zu”, por sempre estarem prontos a ajudar e que indiretamente me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.



Aos professores Reinaldo, Giles, Beth, André e José Eduardo, por terem aceitado avaliar este trabalho, no momento da qualificação ou na defesa da tese. Agradeço, também, aos professores Carlos A. Parada e Thiago M. Cunha, por terem se disponibilizado a participar da banca avaliadora deste trabalho. Certamente, seus conhecimentos irão engrandecer este trabalho.

As agências de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.





## RESUMO

O presente estudo revela que o tratamento oral com os triterpenos pentacíclicos betulina (30 mg/kg), ácido ursólico (50 mg/kg) e ácido oleanólico (30 mg/kg) reduziu a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de Adjuvante Completo de Freund (CFA) e pela ligação parcial do nervo ciático (LPNC). De maneira similar, o tratamento oral com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) significativamente reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pelo CFA ou pelo procedimento de LPNC. Demonstrou-se também que a propriedade analgésica da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina em modelos experimentais de dor persistente é mediada pela ativação direta dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. O tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina foi tão efetivo quanto o tratamento realizado com os agonistas seletivos ACEA (CB<sub>1</sub>, 10 mg/kg; intra-peritoneal [i.p.]) ou JWH-133 (CB<sub>2</sub>, 10 mg/kg; i.p.) em reduzir a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA. O pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (1 mg/kg; i.p.) ou do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 (3 mg/kg; i.p.), bem como o bloqueio da expressão desses receptores através do tratamento com oligonucleotídeo anti-sense (ODN-AS), foram igualmente eficazes em reverter o efeito anti-hiperalgésico demonstrado pela  $\alpha,\beta$ -amirina. O ensaio de ligação específica demonstrou que  $\alpha,\beta$ -amirina pode atuar como um agonista de receptores canabinóides. No ensaio de ligação específica, o composto demonstrou uma grande afinidade pelo receptor CB<sub>1</sub> ( $K_i$  = 0,133 nM) e uma menor afinidade pelo receptor CB<sub>2</sub> ( $K_i$  = 1.989 nM). O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina, ACEA ou JWH-133, em doses efetivas contra a hiperalgesia, não causou qualquer distúrbio de comportamento quando avaliado no ensaio da tétrede. Além disso,  $\alpha,\beta$ -amirina demonstrou uma potente ação antiinflamatória, ao inibir a produção/liberação das citocinas interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e da quimiocina derivada de queratinócitos (KC), bem como a atividade da mieloperoxidase, tanto na pata quanto na medula espinhal de camundongos. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina também foi efetivo em prevenir a ativação do fator de necrose  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e da proteína de ligação ao elemento responsivo AMP cíclico (CREB) e diminuir a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) na pata de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA ou na medula espinhal de camundongos submetidos ao procedimento de LPNC. Os resultados do presente trabalho demonstram, portanto que a  $\alpha,\beta$ -amirina exibe propriedades anti-hiperalgésicas e antiinflamatórias quando avaliadas em dois modelos de dor persistente, via ativação dos receptores canabinóides e pela inibição da produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias e inibição da expressão de NF- $\kappa$ B, CREB e COX-2.



## ABSTRACT

The present study reveals that the oral treatment with the pentacyclic triterpenes betulin (30 mg/kg), ursolic acid (50 mg/kg) and oleanolic acid (30 mg/kg) reduced the mechanical hyperalgesia induced by intraplantar Complete Freund's adjuvant (CFA) injection and partial sciatic nerve ligation (PSNL). Similarly, oral treatment with a mixture of isomers  $\alpha,\beta$ -amyrin (30 mg/kg) significantly reduced mechanical and thermal hyperalgesia induced by i.pl. injection of CFA or PSNL. The analgesic property of the mixture of isomers  $\alpha,\beta$ -amyrin in experimental models of persistent pain is mediated by direct activation of cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. Oral treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin was as effective as the treatment with selective cannabinoid receptor agonists ACEA (CB<sub>1</sub>, 10 mg/kg; intraperitoneal [i.p.]) or JWH-133 (CB<sub>2</sub>, 10 mg/kg; i.p.) in reducing mechanical hyperalgesia induced by i.pl. injection of CFA. Pre-treatment with selective of CB<sub>1</sub> receptor antagonist AM251 (1 mg/kg; i.p.) or CB<sub>2</sub> receptor antagonist AM630 (3 mg/kg; i.p.), as well as knockdown of these receptors through anti-sense oligonucleotide (AS-ODN) treatment, were equally effective in reversing the anti-hyperalgesic effect shown by  $\alpha,\beta$ -amyrin. Receptor binding assays showed that  $\alpha,\beta$ -amyrin may act as a cannabinoid receptor agonist, showed great affinity by CB<sub>1</sub> receptor ( $K_i = 0,133$  nM) and low affinity for CB<sub>2</sub> receptor ( $K_i = 1,989$  nM). Treatment with  $\alpha,\beta$ -amyrin, ACEA or JWH-133, at anti-hyperalgesic doses, did not promote behavioral modifications in the tetrad assay. Moreover,  $\alpha,\beta$ -amyrin showed potent anti-inflammatory action, inhibiting production/secretion of cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumoral necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucine-6 (IL-6) and keratinocyte-derived chemokine (KC), as well as myeloperoxidase activity, in the paw and spinal cord of mice. The isomer mixture  $\alpha,\beta$ -amyrin was also effective in preventing the activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and cyclic AMP response element binding (CREB) and reduced the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the paw and spinal cord of i.pl. CFA injection and PSNL mice, respectively. Our results show that  $\alpha,\beta$ -amyrin exhibits anti-hyperalgesic properties when assessed in two models of persistent pain, acting via cannabinoid receptor activation and inhibition of production/secretion of pro-inflammatory cytokines and inhibition of expression of NF- $\kappa$ B, CREB and COX-2.



## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estrutura dos triterpenos pentacíclicos.....	15
<b>Figura 2.</b> Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos.....	35
<b>Figura 3.</b> Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia térmica e edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de CFA em camundongos.....	37
<b>Figura 4.</b> Efeito do tratamento com a mistura de isômeros $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela LPNC.....	39
<b>Figura 5.</b> Efeito do tratamento preventivo e terapêutico com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC.....	41
<b>Figura 6.</b> Efeito dos triterpenos pentacíclicos na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	43
<b>Figura 7.</b> Efeito do tratamento com os triterpenos pentacíclicos na hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC.....	45
<b>Figura 8.</b> Evidência do envolvimento dos receptores canabinóides no efeito anti-hiperalgésico do tratamento com $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	47
<b>Figura 9.</b> Evidência do envolvimento dos receptores canabinóides no efeito anti-hiperalgésico causado pela $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC.....	48
<b>Figura 10.</b> Seletividade dos antagonistas canabinóides.....	50
<b>Figura 11.</b> Efeito do bloqueio da expressão dos genes dos receptores CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub> no efeito anti-hiperalgésico da $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC.....	51
<b>Figura 12.</b> Efeito do tratamento com ODN-AS na expressão da proteína do receptor CB <sub>1</sub> e do receptor CB <sub>2</sub> na medula espinhal de camundongos após LPNC.....	52
<b>Figura 13.</b> Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina no ensaio de ligação específica do radioligante do receptor CB <sub>1</sub> [ <sup>3</sup> H]-SR141716A ou CB <sub>2</sub> [ <sup>3</sup> H] CP-55,940 .....	53
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento oral com $\alpha,\beta$ -amirina sobre os testes comportamentais na Tetrad.....	54



<b>Figura 15.</b>	Expressão do mRNA para os receptores CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub> na medula espinhal e no córtex de camundongos .....	56
<b>Figura 16.</b>	Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina na ativação dos fatores de transcrição CREB e NF-kB e na up-regulação da enzima COX-2 induzida pela injeção de CFA .....	58
<b>Figura 17.</b>	Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina na ativação dos fatores de transcrição CREB e NF-kB e na up-regulação da enzima COX-2 induzida pela LPNC.....	58
<b>Figura 18.</b>	Papel dos receptores canabinóides no efeito antiinflamatório da $\alpha,\beta$ -amirina na pata de camundongos.....	60
<b>Figura 19.</b>	Papel dos receptores canabinóides no efeito antiinflamatório da $\alpha,\beta$ -amirina na medula espinhal de camundongos.....	61
<b>Figura 20.</b>	Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina na produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias e atividade da mieloperoxidase induzidas pela LPNC.....	63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	Microgramas
<b>µl</b>	Microlítros
<b>AINES</b>	Antiinflamatórios não esteroidais
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AUC</b>	Área sobre a curva
<b>B</b>	Limiar de retirada da pata basal
<b>Cav2.2</b>	Canal iônico de Cálcio
<b>CFA</b>	Adjuvante Completo de Freund
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento responsivo AMP cíclico
<b>DAB</b>	3,3-diaminobenzidina
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>ERK</b>	Proteína quinase regulada por estímulo extracelular
<b>GABA</b>	Ácido gama amino butílico
<b>h</b>	Horas
<b>HIV</b>	Vírus imunodeficiência humana
<b>HTAB</b>	Hexadeciltrimetilamônio
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.pl.</b>	Intraplantar
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>IL-1β</b>	Interleucina- 1 beta
<b>IL-10</b>	Interleucina – 10
<b>IL-3</b>	Interleucina-3
<b>IL-4</b>	Interleucina – 4
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>JNK</b>	C-Jun-N-terminal quinase
<b>KC</b>	Quimiocina derivada de queratinócito
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inibição
<b>LPNC</b>	Lesão parcial do nervo ciático
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<b>min</b>	Minutos
<b>Nav1.7-1.9</b>	Canal iônico de Sódio
<b>NF-κB</b>	Fator de transcrição NF-kappa B
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartato
<b>ODN-AS</b>	Oligonucleotídeo anti-sense

<b>ODN-MS</b>	Oligonucleotídeo missense
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com tampão fosfato
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>THC</b>	Tetrahydrocannabinol
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzina
<b>TNBS</b>	Ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral – alfa
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoilforbol acetato
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular



## SUMÁRIO

	pág.
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Dor .....	1
1.2 Dor Neuropática.....	2
1.3 Dor inflamatória.....	4
1.4 Tratamento da dor.....	5
1.5 O sistema Canabinóide e o tratamento da dor.....	7
1.6 Plantas Medicinais copmo fonte de novos fármacos: o potencial dos triterpenos pentacíclicos.....	11
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 Animais .....	18
3.2 Injeção intraplantar do Adjuvante Completo de Freund.....	18
3.3 Ligação Parcial do Nervo Ciático.....	18
3.4 Protocolos de Tratamento.....	19
3.4.1 Injeção intraplantar de CFA.....	19
3.4.2 Ligação Parcial do Nervo Ciático.....	19
3.4.3 Síntese e liberação de citocinas e atividade da mieloperoxidase.....	20
3.4.4 Envolvimento dos receptores CB1 e CB2 na ação anti-hiperalgésica e antiinflamatória da mistura de isômeros $\alpha,\beta$ -amirina.....	20
3.4.5 Administração intratecal do oligonucleotídeo anti-sense para os receptores CB1 e CB2 .....	21
3.5 Análise do limiar de resposta frente ao estímulo mecânico através do filamento de Von Frey .....	21
3.6 Análise do limiar de sensibilidade térmica ao calor.....	22
3.7 Análise do edema de pata.....	22
3.8 Avaliação comportamental dos efeitos adversos de agonistas canabinóides.....	23
3.8.1 Efeito sobre o desempenho motor (rota-rod).....	23

3.8.2 Temperatura Corporal.....	23
3.8.3 Limiar Basal de sensibilidade térmica ao calor.....	24
3.8.4 Catalepsia.....	24
3.9 Quantificação do RNA mensageiro para os receptores CB1 e CB2.....	24
3.9.1 extração do RNA total.....	24
3.9.2 Confecção do DNA complementar (reação de transcrição reversa.....	25
3.9.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	26
3.10 Ensaio de imunoistoquímica.....	26
3.10.1 Preparo de cortes histológicos e reativação antigênci..	26
3.10.2 Detecção imunológica.....	27
3.11 Dosagem de citocinas.....	29
3.12 Atividade da enzima mieloperoxidase.....	29
3.13 Ensaio de união específica (binding).....	30
3.14 Grogas e reagentes.....	30
3.15 Análise estatística.....	32
4 Resultados.....	34
4.1 efeito anti-hiperalgésico e antiinflamatório da mistura de isômeros $\alpha,\beta$ -amirina sobre a resposta inflamatória e hiperalgésica induzida pela injeção i.pl. de CFA.....	34
4.2 Efeito do tratamento oral com a da mistura de isômeros $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pela ligação parcial do nervo ciático.....	38
4.3 Atividade anti-hiperalgésica dos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido oleanólico e ácido ursólico sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA e LPNC.....	42
4.4 Envolvimento dos receptores canabinóides na ação anti- hiperalgésica da $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA e pela LPNC.....	46
4.5 Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina no ensaio de ligação específica para para [ $^3$ H]-SR141716A (CB <sub>1</sub> ) e [ $^3$ H] CP-55,940 (CB <sub>2</sub> ).....	53

4.6 Avaliação dos efeitos psicomiméticos após tratamento oral com $\alpha,\beta$ -amirina.....	54
4.7 Expressão do mRNA para os receptores CB1 e CB2 na medula espinhal de camundongos após a injeção i.pl. de CFA ou LPNC.....	55
4.8 $\alpha,\beta$ -amirina inibe a ativação dos fatores de transcrição CREB e NF- $\kappa$ B e a expressão da enzima COX-2 induzidos pela injeção i.pl. de CFA ou pela LPNC.....	57
4.9 $\alpha,\beta$ -amirina reduz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e a atividade da mieloperoxidase induzidos pela injeção i.pl. de CFA e após a LPNC.....	59
5 Discussão.....	64
6 Conclusão.....	74
7 Referências Bibliográficas.....	75
Anexos.....	90







## **1. Introdução**

### **1.1. Dor**

A maioria das enfermidades que acometem a humanidade, a maioria delas é acompanhada pela sensação de dor, e estima-se que a prevalência da dor com caráter crônico tenha aumentado consideravelmente, juntamente com os gastos com seu tratamento (Dackis & O'Brien, 2005). Hoje, a dor crônica é considerada o mais subestimado problema de saúde, e afeta de maneira intensa a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (Abdu-Saad, 2010). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), uma em cada cinco pessoas sofre de dor crônica de intensidade moderada a grave, e uma em cada três destas é incapaz de manter um estilo de vida independente e com qualidade. Além disso, metade a 2/3 das pessoas que sofrem de dor crônica são incapazes de se exercitar, dormir normalmente, freqüentar eventos ou desenvolver atividades sociais e realizar atividades normais do dia-a-dia, como caminhar, dirigir e pentear o cabelo (Smith et al., 2000; Barkin et al., 2007).

A dor pode ser modificada por uma série de experiências que envolve não somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também fatores emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (Ji, 2004; Huda, 2010). Enquanto modalidade de percepção sensorial, a dor constitui um sistema de alarme, cujo papel é de proteger o organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supra-espinhais (Le Bars et al., 2001; Costigan et al., 2009; Huda, 2010). Para desempenhar este papel protetor, estímulos térmicos, químicos e mecânicos são detectados pelas terminações periféricas sensoriais de neurônios aferentes primários, chamados de nociceptores, que são responsáveis por transmitir o sinal nociceptivo da periferia até neurônios secundários do corno dorsal da medula espinhal. Na medula espinhal os neurônios de segunda ordem, presentes no corno dorsal, irão transmitir a informação elétrica para o tronco cerebral e tálamo, que por sua vez retransmitem o sinal para o córtex, hipotálamo e sistema límbico (Basbaum et al., 2009; Bingham et al., 2009).

A transmissão do impulso nervoso ocorre através da ativação de três tipos distintos de fibras sensoriais, classificadas de acordo com a velocidade de condução do estímulo e do papel na transdução de informações sensoriais. As fibras responsáveis pela transmissão de estímulos proprioceptivos (toque leve e pressão) e que também estão envolvidas na resposta reflexa do organismo são do tipo A $\beta$ , com alta

velocidades de condução ( $> 30$  m/s), altamente mielinizadas e com baixo limiar de ativação. Os dois outros tipos de fibras, A $\delta$  e C, são primariamente nociceptores, possuindo alto limiar de ativação e respondendo principalmente a estímulos que podem resultar em lesões teciduais. As fibras A $\delta$  são pouco mielinizadas e as fibras C são amielinizadas, com velocidade de condução moderada (2–30 m/s) e lenta ( $\leq 2$  m/s), respectivamente; juntas constituem a maioria dos neurônios presentes no sistema nervoso periférico (Basbaum et al., 2009).

Apesar de seu papel protetor fisiológico, a dor frequentemente perde essa função quando adquire um caráter crônico. Sua longa duração está relacionada a alterações adaptativas como neuroplasticidade do sistema nervoso, induzindo à hipersensibilidade, perda do controle inibitório da dor e reorganização do circuito neuronal do corno dorsal (Basbaum et al., 2009; Costigan et al., 2009). A dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade do organismo de reverter este quadro, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos (Costigan et al., 2009).

Estima-se que um terço da população apresentará algum tipo de dor crônica durante a vida. Na medida em que se vive mais, cresce o número de pessoas com doenças reumáticas, câncer, doenças degenerativas ou infecciosas que podem provocar dores crônicas (Abdu-Saad, 2010). Dentre os diferentes quadros de dor crônica, destacam-se os de dor neuropática e de dor inflamatória de caráter persistente como sendo os mais graves e de difícil tratamento.

## **1.2. Dor neuropática**

A dor neuropática é classificada como “uma consequência direta de uma lesão tecidual ou doença que afeta o sistema somatosensorial” (Loeser e Treede, 2008). Mais do que um sintoma, a dor neuropática é a própria doença, pois a sensação de dor é interminável, podendo durar anos ou décadas após a lesão inicial. Esta dor pode ser resistente a vários tratamentos e, frequentemente está associada à ansiedade, medo, depressão e insônia que conjuntamente são debilitantes, incapacitando o paciente de realizar ações do cotidiano (Costigan et al., 2009; Abu-Saad, 2010; Dworkin et al., 2010).

O surgimento da lesão nervosa pode ocorrer devido a um trauma mecânico, doenças metabólicas (diabetes), uso crônico de medicamentos neurotóxicos (quimioterápicos), infecções (HIV) ou até mesmo por invasão tumoral (Dworkin et al., 2003; Costigan et al., 2009).

A lesão de nervos periféricos é frequentemente acompanhada de inflamação local transitória, a qual contribui para o início da sensação de dor. Sendo assim, na dor neuropática estão envolvidos múltiplos mediadores inflamatórios (Woolf, 2010a; Ji & Strichartz, 2004). Estudos mostram que a extensão da hiperalgesia está diretamente relacionada com a extensão da resposta inflamatória no sítio da lesão do nervo. Além disso, drogas antiinflamatórias aliviam a hiperalgesia em modelos animais de dor neuropática, com lesão de nervos periféricos (Bennett et al., 2000; Woolf, 2010a).

Na dor neuropática a ação dos mediadores sobre seus receptores, tanto em nervos periféricos quanto centrais, inicia uma cascata de sinalização resultando na sensibilização das fibras nociceptivas, ocasionando um aumento na responsividade (hipersensibilidade) a estímulos mecânicos e térmicos no sítio da lesão (Kiguchi et al., 2009; Gao e Ji, 2010). Além disso, há um aumento significativo na quantidade de canais catiônicos, principalmente de cálcio (Cav2.2) e sódio (Nav1.7-1.9) dependentes de voltagem ao longo dos neurônios, os quais são importantes para a condução de potenciais de ação que, na dor neuropática, são também relevantes para a geração de disparos ectópicos (Altier et al., 2007).

Os disparos ectópicos são uma das principais características da dor neuropática, pois contribuem para a hiper-excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, provocando assim reorganização e alterações nas fibras sensoriais, resultando na amplificação do quadro nociceptivo (Costigan et al., 2009).

Em estados não patológicos, as fibras nociceptivas primárias Aδ e C terminam nas lâminas superficiais I e II do corno dorsal da medula espinhal, enquanto que fibras altamente mielinizadas e não nociceptivas (Aα e Aβ) têm suas terminações nas lâminas III e V (Basbaum et al., 2009). Já no processo de dor neuropática, há uma reorganização anatômica das fibras Aβ, que passam a fazer sinapse na lamina II da medula espinhal, transmitindo estímulos nocivos através da ativação de neurônios nociceptivos espinhais por estímulos inócuos (Woolf, 2010b; Ji et al., 2007; Miraucourt et al., 2007).

A sensibilização central é uma das características mais marcantes da dor neuropática, caracterizada pelo aumento da ativação dos neurônios e circuitos nociceptivos devido ao aumento na excitabilidade das membranas neuronais e à facilitação sináptica. Isto resulta em um aumento dos sinais nociceptivos, ocasionando um estado de facilitação, potencialização e até mesmo amplificação dos sinais vindos da periferia

(Latremoliere e Woolf, 2009). A sensibilização central é originada por um aumento da liberação de inúmeros neurotransmissores, como o glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no corno dorsal da medula espinhal. Estes neurotransmissores ligam-se aos seus respectivos receptores no corno dorsal da medula espinhal e causam a ativação de cascatas intracelulares, incluindo a ativação da proteína quinase C (PKC), MAP-quinases e fatores de transcrição, os quais contribuem para a manutenção do quadro de excitabilidade neuronal. A liberação constante de neurotransmissores pode ainda causar um quadro de excitotoxicidade na medula espinhal, o qual contribui para a diminuição da liberação de neurotransmissores inibitórios e a degeneração dos interneurônios inibitórios da dor (Costigan et al., 2009; Gold & Gebhart, 2010).

Em modelos de dor neuropática há uma diminuição significativa da atividade do ácido gama amino butílico (GABA) e das correntes glicinérgicas inibitórias (Sivilotti et al., 1994; Moore et al., 2002), contribuindo para a apoptose dos interneurônios inibitórios. Além disso, há grande diminuição da expressão de receptores opioidérgicos, particularmente do receptor  $\mu$  (Kohn et al., 2005), fazendo com que sejam necessárias doses cada vez maiores de opióides para o alívio da dor. Em conjunto, esses dados demonstram que a sensibilização central contribui para a manutenção da dor neuropática, e ainda contribui para o surgimento da hiperalgesia extra-territorial, isto é, hiperalgesia sentida em locais distantes do sítio da lesão (Latremoliere & Woolf, 2009; Voscopoulos & Lema, 2010).

### **1.3. Dor inflamatória**

A dor inflamatória, por sua vez, ocorre em resposta a uma lesão tecidual que desencadeia uma resposta inflamatória subsequente.

O processo inflamatório se caracteriza pelo aparecimento de alguns sinais clássicos da inflamação, como rubor e o calor, os quais são decorrentes da vasodilatação local. Essa vasodilatação periférica pode levar à remoção do agente estranho, como toxinas e bactérias, bem como proporcionar o influxo de células de defesa para o local lesionado (Woolf e Ma 2007; Rittner et al., 2008). Além desses eventos celulares e vasculares, há o aparecimento de um sinal comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar a estímulos não-nociceptivos, ou seja, a hiperalgesia e alodínia, repectivamente. A alteração na sensibilidade dolorosa ocorre devido à plasticidade neuronal que pode ocorrer tanto no sistema nervoso

periférico (SNP) quanto no sistema nervoso central (SNC). Essa sensibilidade é devida à liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes, bem como de células migratórias recrutadas para o local da lesão tecidual (Woolf e Ma 2007; Loeser e Treede 2008).

Tanto a liberação de mediadores primários quanto a síntese de novos mediadores são responsáveis pela ativação e/ou sensibilização de nociceptores adjacentes à lesão. A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação de fibras nervosas, aumentando a probabilidade de que estas disparem em resposta a estímulos de menor intensidade (Abrahamsen et al., 2008; Coutaux et al., 2005). Desta forma, estes nociceptores são ativados por estímulos que normalmente seriam inócuos (Coutaux et al., 2005). Isto é bem evidenciado através de modelos experimentais, onde a injeção de um agente pró-inflamatório, como a injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund (CFA), sensibiliza os locais injetados, tornando estes animais responsivos a estímulos térmicos e mecânicos (Larson et al., 1986). De fato, a dor é uma característica peculiar da inflamação e a dor inflamatória é o maior problema clínico em vários distúrbios inflamatórios, como, por exemplo, a artrite reumatóide (MacMahon et al., 2005; Abrahamsen et al., 2008).

Portanto, nestas situações encontra-se um quadro de estimulação constante dos nociceptores, a qual é reponsável por alterações plásticas, não somente no tecido nervoso periférico, mas também em nível central. Isto é muito comum em casos de neuropatia periférica, onde a lesão nervosa gera um processo inflamatório crônico, com alterações plásticas no SNP e SNC (Woolf & Salter, 2000; Ji & Woolf, 2001; Ji & Strichartz, 2004). De fato, do ponto de vista clínico, um dos aspectos mais problemáticos da dor de origem inflamatória é a possibilidade da progressão de um estado agudo para um estado prolongado, podendo desta forma, aumentar a susceptibilidade de instalação de um quadro de dor inflamatória crônica (Woolf & Mannion, 1999; Mendell & Sahenk, 2003; Costigan et al., 2009; Austin & Moalem-Taylor, 2010). Nestas condições, a inflamação perde sua característica protetora, tornando-se patológica.

#### **1.4. Tratamento da Dor**

Apesar do aumento das opções terapêuticas para o controle e alívio da dor crônica observado nos últimos anos, a grande maioria dos tratamentos não produz resultados satisfatórios. Além do alívio limitado da dor crônica obtido por fármacos, o tratamento torna-se ainda mais

difícil em função da estreita janela terapêutica e do aparecimento de efeitos colaterais muitas vezes intoleráveis. Dentre os tratamentos farmacológicos disponíveis na clínica incluem-se as drogas antiinflamatórias, anestésicos locais, analgésicos opióides e não-opióides, drogas antidepressivas, anticonvulsivantes e antiarrítmicos (Dworkin et al., 2010).

Os medicamentos com ação antiinflamatória, tais como os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), são utilizados com frequência para o alívio de dores crônicas, devido às suas ações analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias. No entanto, a eficácia analgésica limitada e o desenvolvimento de reações adversas, tais como hipertensão arterial, ulceração gástrica e hemorragia, além dos riscos de problemas cardíacos, limitam o uso clínico continuado destes medicamentos (Graham et al., 2005). A utilização de agonistas opióides é eficaz em casos de dor crônica, no entanto causam efeitos adversos bastante comuns como constipação intestinal, sedação, depressão respiratória, dentre outros, além de poder ocasionar dependência e tolerância (Berrocoso et al., 2009).

Atualmente os medicamentos mais utilizados para o tratamento da dor crônica são os antidepressivos tricíclicos e os anticonvulsivantes. Diversos estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que os antidepressivos tricíclicos são efetivos em reduzir dores relacionadas à neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética, fibromialgia, dentre outras (Manson, 2010). De maneira interessante, seus efeitos analgésicos não estão relacionados aos seus efeitos antidepressivos, sendo que doses menores são suficientes para aliviar as dores crônicas de pacientes, quando comparadas àquelas utilizadas no tratamento da depressão. O mecanismo de ação dos antidepressivos tricíclicos vai além da inibição da recaptação de noradrenalina e serotonina, e inclui ainda o aumento das concentrações de opióides endógenos através de vias indiretas, que induz o bloqueio de canais de sódio e abertura de canais de potássio, além de bloquearem receptores NMDA para glutamato (ácido N-metil-D-aspartato) (Eisenach e Gebhart, 1995; Jesse et al., 2009; Yan et al., 2010). Apesar de todas essas ações contribuírem para seus efeitos analgésicos, o uso dos antidepressivos é limitado devido à instalação lenta das suas ações (de dias a semanas) e ao aparecimento de efeitos adversos, tais como sedação, hipotensão postural, constipação intestinal e boca seca (Lynch, 2008).

As drogas anticonvulsivantes têm uma boa ação analgésica em modelos de dor neuropática e inflamatória persistentes, sendo que a gabapentina é um dos medicamentos anticonvulsivantes mais utilizados



para o tratamento da dor de caráter crônico. Sua ação ocorre devido à ligação, com alta afinidade, à subunidade  $\alpha_2\text{-}\delta$  dos canais de cálcio dependente de voltagem e, com isso, inibição das correntes de cálcio necessárias para a liberação de neurotransmissores pelos terminais sinápticos e transmissão do estímulo nociceptivo (Bauer et al., 2009). A gabapentina apresenta efeito antinociceptivo em diferentes tipos de dores crônicas, com boa tolerabilidade e baixa incidência de efeitos colaterais, sendo relatado apenas leve tontura e sonolência no início do tratamento (Tzellos et al., 2008).

O envolvimento de vias periféricas na transmissão da dor e a alta incidência de efeitos colaterais observada após a administração sistêmica de diferentes medicamentos estimularam o desenvolvimento de medicamentos tópicos para o controle de dor neuropática e inflamatória persistentes. Atualmente, estão disponíveis na clínica formulações tópicas de AINES, capsaicina, anestésicos e antidepressivos (Dogrul et al., 2003). A administração local destes medicamentos reduz a dor localmente, e sua aplicação resulta em pouco (irritações cutâneas) ou nenhum efeito colateral devido à baixa absorção sistêmica. No entanto, a medicação tópica deve ser utilizada como um adjuvante de outras terapias, uma vez que a mesma, isoladamente, não é capaz de eliminar totalmente os quadros de dor.

O aparecimento de efeitos colaterais sérios e a estreita janela terapêutica contribuem para a pequena quantidade de opções eficazes para o tratamento de dores crônicas. Dentre os pacientes que são tratados com os medicamentos disponíveis na clínica, cerca de 10–15% não respondem a nenhuma das farmacoterapias existentes, e entre 15–20% apresentam apenas alívio parcial dos sintomas (Abu-Saad, 2010). Sendo assim, existe a necessidade de identificar novas terapias que possam ser úteis para o tratamento da dor crônica.

### **1.5. O sistema canabinoide e o tratamento da dor**

Dentre as novas terapias que estão sendo investigadas, os agonistas dos receptores canabinóides têm demonstrado potencial efeito terapêutico. O interesse em seu estudo emana de efeitos positivos no controle de dores crônicas, da presença de receptores canabinóides em áreas moduladoras da dor, tanto no sistema nervoso central como sistema nervoso periférico, e devido à presença de endocannabinóides capazes de modular os mecanismos de dor em nível do sistema nervoso central (Peat, 2010).

Os canabinóides exercem seus efeitos antiinflamatórios e analgésicos através da interação com dois subtipos de receptores denominados receptor canabinóide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) e receptor canabinóide do tipo 2 (CB<sub>2</sub>) (Munro et al., 1993). Anatomicamente, o receptor CB<sub>1</sub> está majoritariamente expresso no SNC, particularmente no hipocampo, córtex, cerebelo e gânglios basais (Matsuda et al., 1990; Tsou et al., 1998; Kawamura et al., 2006). Por outro lado, o receptor CB<sub>2</sub> está expresso principalmente, mas não exclusivamente, em células do sistema imune, como macrófagos, monócitos e neutrófilos. A expressão de receptores CB<sub>2</sub> tem sido encontrada também no sistema nervoso central (SNC), incluindo medula espinhal, tronco cerebral e córtex, além da micróglia (Morgan, 2009; Van et al., 2005; Beltramo et al., 2006). Tanto o receptor CB<sub>1</sub> quanto o receptor CB<sub>2</sub> são acoplados à proteína G<sub>i/o</sub> e sua ativação resulta na inibição da adenilil ciclase e na estimulação das vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), como ERK, p-38 e JNK (Felder et al., 1995; Bridges et al., 2001; Bosier et al., 2008).

A ativação de receptores CB<sub>1</sub> pode aumentar ou inibir o aumento dos níveis de Ca<sup>+2</sup> induzido pelo NMDA, dependendo do tipo celular, do tipo da interação canabinóide e das vias de sinalização ativadas subsequentes (Lozavaya et al., 2009). Dessa forma a ativação do receptor CB<sub>1</sub> confere proteção contra excitotoxicidade induzida pelo NMDA em cultura de neurônios (van der Stelt & Di Marzo, 2005), através da inibição da liberação da Ca<sup>+2</sup> intracelular (Zhuang et al., 2005), pela sua atividade anti-oxidante (Marsicano et al., 2002), pela sinalização da proteína quinase A (PKA) e pela geração de óxido nítrico (Kim et al., 2006). Em contraste, a ativação do receptor CB<sub>1</sub> pode resultar no aumento da liberação de Ca<sup>+2</sup> induzida pelo NMDA, do estoque sensível ao IP3 (inositol trifosfato), em neurônios da camada granular do cerebelo (Netzeband et al., 1999).

No sistema nervoso central, os receptores canabinóides possuem localizações distintas. Enquanto o receptor CB<sub>1</sub> está localizado nos axônios, especialmente nos terminais pré-sinápticos, o receptor CB<sub>2</sub> está presente nas terminações dendríticas, nos corpos celulares de neurônios e em células gliais (Onaivi et al., 2006; Cabral et al., 2008; Morgan et al., 2009). Devido a estas localizações estratégicas propõe-se que estes receptores desempenham efeitos antinociceptivos importantes no sistema nervoso central. Estes efeitos são confirmados por trabalhos que demonstram que a administração, local ou sistêmica, de agonistas não seletivos para os receptores canabinóides reduz a hiperalgesia mecânica e térmica quando testados em modelos animais de dor

neuropática (Herzberg et al., 1997; Bridges et al., 2001; Fox et al., 2001; Ibrahim et al., 2003; Elmes et al., 2004; Guindon & Beaulieu, 2006).

A administração de agonistas canabinóides de ocorrência natural ou sintética tem demonstrado importante valor terapêutico em algumas situações clínicas, tais como dor, ansiedade, náusea, espasmos musculares e doenças degenerativas (Tramèr et al., 2001; Rog et al., 2007). Sabe-se que os agonistas canabinóides possuem efeitos antinociceptivos e anti-hiperalgésicos tanto por ações em sítios periféricos quanto no sistema nervoso central (medula espinhal e centros supraespinhais), (Valenzano et al., 2005; Sagar et al., 2005; Whiteside et al., 2005; Elikottil et al., 2009).

Alguns trabalhos ressaltam ainda que a ativação do receptor CB<sub>1</sub> está relacionado com o efeito antihiperalgésico em processos nociceptivos persistentes, inibindo a hiperalgisia mecânica e térmica após inflamação periférica (Richardson et al., 1998 a, b; Martin et al., 1999), após injeção intraplantar de capsaicina (Li et al., 1999), ou após a lesão de nervos periféricos (Herzberg et al., 1997).

De maneira semelhante, o receptor CB<sub>2</sub> também contribui para a diminuição da resposta nociceptiva, por inibir a liberação de mediadores pró-inflamatórios de células não neuronais localizadas próximas aos terminais nociceptivos (Jhaveri e Sagar, 2007; Rahn et al., 2007; Hohmann et al., 2007; Giblin et al., 2007).

Diversas evidências indicam a presença dos receptores canabinóides no SNC de roedores e humanos, e estes receptores podem ter sua expressão aumentada em resposta a danos neurais ou em doenças crônicas (Onaivi et al., 2006; Fernandez-Ruiz et al., 2007). Assim, o aumento do número de receptores canabinóides sugere que eles possuem funções importantes em tais situações. Este aumento na expressão dos receptores canabinóides pode ocorrer em células que normalmente expressam estes receptores, ou em células que são recrutadas para o sítio da lesão (Fernandez-Ruiz et al., 2007). Por exemplo, em modelos animais de dor neuropática ocorre aumento na expressão do receptor CB<sub>1</sub> nas estruturas neurais envolvidas com o processamento da dor, tais como nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (Lim et al., 2003) e no tálamo (Siegling et al., 2001). Em modelos de dor crônica associados ao dano neural periférico ocorre um aumento na expressão do receptor CB<sub>2</sub> na medula espinhal, o qual parece estar relacionado ao aumento da ativação da micrógliia (Cabral et al., 2008). Outros estudos sugerem que os receptores CB<sub>2</sub> não atuam somente em células gliais, mas também estão envolvidos na regulação das funções

neuronais. Ademais, o aumento dos receptores CB<sub>2</sub> pode contribuir enormemente para a resposta antinociceptiva central (Beltramo et al., 2006).

As substâncias isoladas da espécie *Cannabis sativa* L. são denominadas terpenofenólicos, e dentre as 60 substâncias identificadas destaca-se o  $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol (THC), um agonista preferencial dos receptores CB<sub>1</sub> (Mechoulam et al., 1967; Gertsch, 2010). No entanto, nos últimos anos, diversas substâncias isoladas de plantas, que não a *Cannabis sativa* L., também vêm demonstrando afinidade pelos receptores canabinóides, sendo definidas como fitocanabinóides.

Dentre os fitocanabinóides, destacam-se algumas *N*-alquilamidas (alcamidas), isoladas da planta *Echinacea spp.*, que demonstraram interagir funcionalmente com receptores CB<sub>2</sub> de humanos. Estes compostos apresentam efeitos antiinflamatórios, inibindo a expressão do mRNA da citocina fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ) em monócitos/macrófagos humanos, via ativação do receptor CB<sub>2</sub> (Raduner et al., 2006; 2007). Além disso, estes fitocanabinóides foram eficazes em inibir a liberação das citocinas TNF- $\alpha$  e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) induzidas pelo lipopolissacarídeo (LPS) em cultura de monócitos e ainda induziu a produção das citocinas antiinflamatórias interleucina-3 (IL-3), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10); semelhantes aos efeitos demonstrados pelo endocanabinóide anandamida (Raduner, 2007). Além das *N*-alquilamidas isoladas da *Echinacea spp.*, outro fitocanabinóide descrito recentemente como agonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> é o sesquiterpeno bicíclico beta-cariofileno (Gertsch, 2008). Quando administrado pela via oral, o cariofileno apresentou importante atividade antiinflamatória e analgésica em camundongos do tipo selvagem, mas não em camundongos com deleção gênica do receptor CB<sub>2</sub>, evidenciando sua ligação funcional com este receptor (Gertsch, 2010).

Neste contexto, a busca de novas substâncias que possam interagir, de forma direta ou indireta, com o sistema canabinóide e que sejam desprovidas de efeitos colaterais relevantes, sobretudo no SNC, é de grande importância para o tratamento da dor crônica. O potencial terapêutico de algumas plantas, como as demonstradas anteriormente, vem de encontro com este propósito.

### **1.6. Plantas medicinais como fonte de novos fármacos: o potencial dos triterpenos pentacíclicos**

As plantas com potencial para uso medicinal são frequentemente utilizadas com o intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de diversas doenças, seja pelo baixo custo, ou pela facilidade de obtenção. O uso das espécies vegetais com a finalidade de tratamento ou cura de doenças e seus sintomas, se perpetuou na história da civilização e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial. Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa devido à ausência de métodos de síntese química, a qual teve início no final do século XIX. Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese (Calixto et al., 2000). Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, oriundos de apenas 90 espécies (Koehn et al., 2005). Atualmente, a maior dificuldade em incorporar o uso dos compostos derivados de plantas na terapêutica convencional ocorre devido à falta de dados científicos que comprovem sua eficácia e a sua segurança.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) declara que 80% da população mundial fazem uso de algum tipo de composto medicinal oriundo de planta para alívio de sintomas dolorosos ou desagradáveis e reconhece cerca de 150 plantas com real valor terapêutico utilizadas na fitoterapia, e ainda declara que 11% dos 252 medicamentos considerados essenciais são derivados de plantas (Rates, 2001). Além disso, cerca de 49% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (Koehn & Carter, 2005).

O Brasil representa um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos, uma vez que contém a maior biodiversidade do planeta, com mais de 55 mil espécies de plantas superiores e cerca de dez mil briófitas, fungos e algas, um total equivalente a quase 25% de todas as espécies de plantas existentes no planeta (Kato, 2001).

Entretanto, algumas plantas apresentam, quando utilizadas para fins terapêuticos, propriedades tóxicas aliadas as suas propriedades

curativas, que ocorrem devido à ampla diversidade de metabólitos secundários, os quais possuem diferentes atividades biológicas (Farnsworth et al., 1985; Simões, 2003). A fantástica variedade e complexidade de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas têm contribuído de forma significativa para o provimento de substâncias úteis ao tratamento de diversas doenças que acometem a população (Montanari & Bolzani, 2001). Acredita-se que essa vasta gama de metabólitos secundários teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (Phillipson & Anderson, 1989). Dentre as diversas categorias de metabólitos secundários, podemos destacar os terpenóides, os glicosídeos, os alcalóides e os fenóis, dos quais já foram isolados princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças (MCCaskill e Croteau, 1998).

O maior grupo de metabólitos secundários presente no reino vegetal é o dos terpenóides, dos quais Já foram isolados aproximadamente 30.000 substâncias. Número este, muito superior ao de qualquer outro grupo de derivado de produtos naturais. Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores, sendo também encontrados em menor quantidade em fungos e organismos marinhos. Os terpenóides de origem vegetal desempenham funções importantes como defesa, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais, além de funcionarem como moléculas de sinalização (Veerpote, 2000). O número de unidades de isoprenos incorporadas em determinado terpeno serve como base para a classificação desses compostos. Assim, os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e os tetraterpenos ou carotenos possuem 2, 3, 4, 6 ou 8 unidades de isopreno, respectivamente.

Muitos compostos produzidos por plantas são de interesse farmacológico, como por exemplo, digoxina (um triterpeno isolado da espécie *Digitalis sp*), taxol (um diterpeno isolado da espécie *Taxus brevifolia*), a morfina (um alcalóide isolado da espécie *Papaver somniferum*), o quinino (um alcalóide isolado da casca da espécie da *Chinchona sp*), bem como os alcalóides derivados dos monoterpenos vincristina e camptoricina, os quais são utilizados na clínica para o tratamento do câncer (MCCaskill e Croteau, 1998).

Os triterpenos recebem um destaque especial com grandes potencialidades em atividades biológicas, atuando como

antiinflamatórios, bacterianos, fungicidas, antivirais, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (Calixto, 2003; 2004). São moléculas formadas por 6 unidades de isopropeno e constituídas por trinta átomos de carbono (C<sub>30</sub>), cadeia policíclica, normalmente tetra ou pentacíclica, quase sempre hidroxilados na posição C-3. Já foram isolados mais de 4.000 triterpenos naturais e identificados mais de 40.000 tipos de esqueletos (Robbers et al., 1997). Os triterpenos pentacíclicos derivam do arranjo do epóxido do esqualeno, comumente encontrado em plantas. A estrutura policíclica (abordando apenas os pentacíclicos) pode ter cinco anéis de seis membros, os oleananos e ursanos, ou quatro anéis de seis membros e um de cinco, os lupanos e hopanos. Os triterpenóides pentacíclicos abordados neste trabalho apresentam três tipos de estrutura base. O ácido oleanólico e a  $\beta$ -amirina pertencentes à família dos oleananos, o ácido ursólico e a  $\alpha$ -amirina pertencentes à família dos ursanos e a betulina à família dos lupanos.

Os triterpenos pentacíclicos têm recebido destaque na literatura por apresentarem diversas atividades biológicas. O triterpeno pentacíclico ácido ursólico (**Figura 1A**) apresenta atividade antiinflamatória (Máñez et al., 1997; Chattopadhyay et al., 2002; Aguirre et al., 2006; Saaby et al., 2010; Liu et al., in press), antimicrobiana (Chattopadhyay et al., 2002), anti-oxidante (Ovesná et al., 2006), hepatoprotetora (Liu et al., 1995) e anti-tumoral (Gao et al., 2007; Huang et al. 1994). Seu isômero, o ácido oleanólico (**Figura 1B**), apresenta atividades semelhantes como anti-oxidante (Ovesná et al., 2006), antiinflamatória (Singh et al., 1992; Cho et al., 2010; Saaby et al., 2010; Lin et al., 2010), hepatoprotetora (Liu et al., 1995, 1998), anti-tumoral (Hsu et al., 1997; Gao et al., 2007) e efeito antinociceptivo (Maia et al., 2006a; Maia et al., 2006b; Freitas et al., 2009). Enquanto o tratamento com o triterpeno pentacíclico lupano betulina (**Figura 1C**) reduziu a inflamação (Takada & Aggarwal, 2003; Aguirre et al., 2006) e o crescimento tumoral (Takada & Aggarwal, 2003; Mutai et al., 2004).

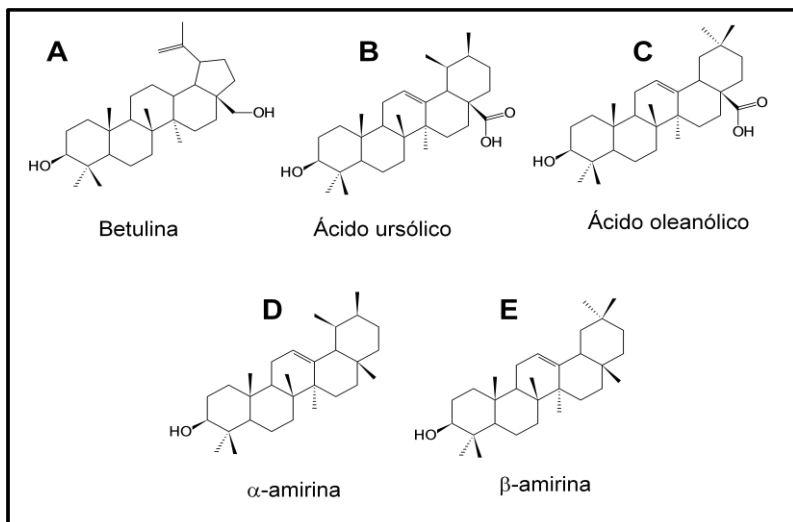
Estes triterpenos pentacíclicos são encontrados em diversas plantas, incluindo as espécies do gênero *Protium*, as quais são utilizadas na medicina popular para o tratamento de sintomas inflamatórios. No Brasil, as resinas e folhas destas espécies são popularmente utilizadas para o tratamento de úlceras e outros sintomas inflamatórios (Corrêa, 1984). O extrato solúvel em éter das resinas *Protium kleinii* também demonstrou atividade antinociceptiva em modelos de dor inflamatória, além da ação antiinflamatória tópica em modelos de inflamação induzida pelo TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato) (Otuki et al.,

2005b). A presença de uma série de triterpenos pentacíclicos, foi revelada neste extrato, através de análises fitoquímicas, dos quais podemos destacar uma mistura de isômeros, a  $\alpha$ -amirina (**Figura 1D**) e a  $\beta$ -amirina (**Figura 1E**) (Recio et al., 1995). Destacamos ainda, a atividade antiinflamatória, demonstrada pelo tratamento tópico com  $\alpha$ -amirina, quando avaliada em modelos de inflamação tópica induzidas por TPA, diminuindo a formação de edema, o influxo de neutrófilos e a expressão da citocina IL-1 $\beta$  (Otuki et al., 2005b). Esta ação parece estar envolvida com a capacidade da  $\alpha$ -amirina em inibir os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), comprovado com a inibição da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) via inibição da proteína quinase regulada por estímulo extracelular (ERK), p38 e bloqueio da ativação do fator de transcrição NF-kappa B (NF-kB) (Medeiros et al., 2007). Já a mistura, 1:1 dos dois triterpenos,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, apresentou atividade antinociceptiva quando administrado sistemicamente, em sítios espinhais e supra-espinhais em roedores. A  $\alpha,\beta$ -amirina inibiu as vias das proteínas quinase A e C (PKA e PKC) (Otuki et al., 2005b). Corroborando esses resultados, a  $\alpha,\beta$ -amirina também demonstrou ser eficaz na proteção contra o dano hepático induzido pelo acetaminofeno (Oliveira et al., 2005a), na atenuação da dor aguda e dor visceral (Oliveira et al., 2005b; Lima-Junior et al., 2006), além de apresentar atividade ansiolítica e antidepressiva (Aragão et al., 2006). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o tratamento intraperitonial (i.p.) com  $\alpha,\beta$ -amirina foi capaz de inibir o processo inflamatório decorrente da colite experimental induzida por TNBS (ácido 2,4,6 trinitrobenzeno sulfônico), diminuindo os níveis teciduais de IL-1 $\beta$ , que por sua vez reduziu a ativação do fator de transcrição NF-kB, reduzindo também a síntese do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (Vitor et al., 2009).

Embora existam estudos relacionados à ação antiinflamatória e antinociceptiva dos compostos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha,\beta$ -amirina, seus efeitos em modelos de dor crônica e inflamatória, bem como o mecanismo acerca dessas ações, ainda encontram-se obscuros. Neste contexto, o presente estudo investigou, através de ensaios funcionais, o efeito antinociceptivo crônico destes compostos em dois modelos de dor persistente: a injeção intraplantar (i.pl.) de CFA e a ligação parcial do nervo ciático (LPNC). Tendo em vista a marcada ação antiinflamatória e antinociceptiva do tratamento oral com a mistura  $\alpha,\beta$ -amirina nos modelos acima mencionados, investigou-se também sua interação com o sistema



canabinóide, mais especificamente com os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, e outros possíveis mecanismos pelos quais a  $\alpha,\beta$ -amirina poderia exercer o controle da dor.



**Figura 1:** Estrutura dos triterpenos pentacíclicos. (A) Ácido Ursólico, (B) Ácido Oleanólico, (C) Betulina, (D)  $\alpha$ -amirina e (E)  $\beta$ -amirina.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar, através de ensaios funcionais e moleculares a ação antinociceptiva dos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha,\beta$ -amirina, em modelos experimentais de dor persistente, do tipo inflamatória e neuropática, bem como os mecanismos de ação subjacentes a esses efeitos.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do tratamento oral agudo e prolongado com os compostos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido oleanólico e ácido ursólico sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA e pela LPNC;
- Avaliar a influência do tratamento oral agudo e prolongado com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica e térmica e resposta edematogênica induzida pela injeção i.pl. de CFA e pela LPNC, bem como efeito do tratamento local sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA;
- Investigar a participação do sistema canabinóide na ação antihipernociceptiva do composto  $\alpha,\beta$ -amirina na hipernocicepção induzida pela injeção i.pl. de CFA e pela LPNC, através do uso de antagonistas seletivos para cada receptor;
- Avaliar o efeito do tratamento oral com o composto  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a manutenção da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela LPNC em camundongos nos quais a expressão dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>;
- Investigar uma possível ligação do composto  $\alpha,\beta$ -amirina com os receptores canabinóides, através do ensaio de ligação específica, bem como ensaio de tétrade;
- Avaliar a capacidade do composto  $\alpha,\beta$ -amirina em alterar a expressão tanto da proteína quanto do RNA mensageiro dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na medula espinhal de camundongos submetidos à LPNC;
- Avaliar a influência do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a produção e/ou liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e a quimiocina KC e atividade da enzima mieloperoxidase

na pata e na medula espinhal de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA e na medula espinhal de camundongos submetidos à LPNC;

- Avaliar a capacidade do composto  $\alpha,\beta$ -amirina em inibir a ativação dos fatores de transcrição CREB e NF- $\kappa$ B e em alterar a expressão da enzima COX-2 na pata de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA ou na medula espinhal de camundongos submetidos à LPNC.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos machos Swiss (pesando entre 25 e 30 g) e ratos Wistar (pesando entre 250 e 300 g), criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em ciclo 12 h claro/12 h escuro, com água e ração fornecidos *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes farmacológicos, realizados geralmente entre 8 e 17 h, a temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os experimentos descritos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais de cuidados com os animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983). O Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou todos os procedimentos experimentais (número de protocolo PP00148/UFSC). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizado foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos com as drogas.

#### **3.2. Injeção intraplantar do Adjuvante Completo de Freund**

Os camundongos foram cuidadosamente imobilizados e receberam uma injeção intraplantar (i.pl.) contendo 20  $\mu\text{l}$  de Adjuvante Completo de Freund (CFA; 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, inativado por calor e diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de solução salina tamponada com tampão fosfato (PBS, composição mmol/L NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10).

#### **3.3. Ligação parcial do nervo ciático**

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com hidrato de cloral 7% (0,6 ml/kg). Para a ligação parcial do nervo ciático (LPNC), foi realizada uma incisão na coxa, o nervo ciático então foi exposto próximo à trifurcação ciática e ligado em volta de aproximadamente 1/3 a 1/2 da porção dorsal, com fio de sutura 8.0, conforme o procedimento descrito em ratos por Seltzer *et al.* (1990) e adaptado para camundongos por Malmberg e Basbaum (1998). Em um grupo separado de animais, o nervo ciático foi exposto, mas não envolto com fio de sutura (falso-operados).

### **3.4. Protocolos de Tratamento**

**3.4.1. Injeção intraplantar de CFA:** Para a avaliação da hiperalgesia mecânica e ou térmica, diferentes grupos de camundongos foram tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (3, 10 e 30 mg/kg), betulina (30 mg/kg), ácido oleanólico (30 mg/kg), ácido ursólico (50 mg/kg) ou com o veículo utilizado para diluir os compostos (5% tween/5% etanol/90% PBS) por gavagem (v.o.) 1 hora antes da injeção i.pl. de CFA. A avaliação do limiar mecânico e ou térmico foi iniciada 1 hora depois da injeção i.pl. de CFA. A fim de investigar os efeitos de um tratamento prolongado com os compostos pentacíclicos  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.), betulina (30 mg/kg), ácido oleanólico (30 mg/kg), ácido ursólico (50 mg/kg) os compostos foram novamente administrados no terceiro dia após a injeção i.pl. de CFA, período em que a resposta hiperalgésica já se encontra re-estabelecida. O tratamento foi realizado durante cinco dias consecutivos e 7 dias após a interrupção, o tratamento foi reiniciado por mais 5 dias consecutivos (apenas para o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina). A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada diariamente, sempre 3 horas após o tratamento com os compostos pentacíclicos.

Para avaliação da resposta inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CFA, diferentes grupos de camundongos foram tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) por gavagem 1 h antes da injeção i.pl. de CFA. A avaliação da resposta inflamatória foi iniciada 1 h após a injeção i.pl. de CFA.

Com o intuito de verificar o efeito anti-hiperalgésico da administração local (i.pl.) de  $\alpha,\beta$ -amirina, os camundongos receberam uma injeção i.pl. de CFA e 24 horas depois receberam o tratamento local (i.pl.) com a mistura dos isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30  $\mu$ g/pata). A avaliação da hiperalgesia mecânica iniciou 30 min após o tratamento com o composto, perdurando até 4 horas após o tratamento.

**3.4.2. Ligação Parcial do Nervo Ciático:** O tratamento com a mistura dos isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (3-30 mg/kg; v.o.) foi realizado por gavagem, 1 hora antes (pré-tratamento) ou no 4º dia após a LPNC (pós-tratamento). No entanto, o tratamento com os demais compostos pentacíclicos, betulina (30 mg/kg), ácido oleanólico (30 mg/kg), ácido ursólico (50 mg/kg), foi realizado somente no 4º dia após LPNC. A avaliação da hiperalgesia mecânica e térmica foi realizada no 4º dia após LPNC.

Com o intuito de verificar o efeito de um tratamento prolongado com os compostos pentacíclicos betulina, ácido oleanólico, ácido ursólico e  $\alpha,\beta$ -amirina o tratamento foi realizado por 5 dias consecutivos (1 vez ao dia) (do 4º ao 8º dia após LPNC). Somente o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina foi suspenso no 8º dia e re-iniciado no 13º ao 17º dia após a LPNC.

**3.4.3. Síntese e liberação de citocinas e atividade da mieloperoxidase:** Diferentes grupos de camundongos foram pré-tratados com o composto  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) 30 min antes da injeção i.pl de CFA ou do procedimento de LPNC. Os animais foram sacrificados e a pele da pata posterior e a porção lombar da medula espinhal (L3-L5) foram removidos em diferentes tempos após a injeção i.pl. de CFA ou somente a porção lombar da medula espinhal, em diferentes tempos após a LPNC. Os tecidos coletados foram devidamente processados para a quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e KC pelo método de ELISA, bem como para a avaliação da atividade da mieloperoxidase através do ensaio de mieloperoxidase.

**3.4.4. Envolvimento dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na ação anti-hiperalgésica e antiinflamatória da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina:** Para investigar o possível envolvimento dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na ação anti-hiperalgésica da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina, diferentes grupos de camundongos foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (1 mg/kg) (Liu & Walker, 2006), ou com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 (3 mg/kg) (Rousseaux et al., 2007), 24 após a injeção i.pl. de CFA ou no 4º dia após LPNC. Trinta minutos após o tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, os camundongos receberam a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.), o agonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA (10 mg/kg; i.p.) (Meybolm et al., 2008), ou o agonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, JWH-133 (10 mg/kg;i.p.) (Meybolm et al., 2008). A avaliação da hiperalgesia mecânica iniciou 30 min após o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina ou com os agonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>.

Para investigar o envolvimento dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na ação antiinflamatória demonstrada pela mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina, diferentes grupos de camundongos foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (1 mg/kg) ou com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>,

AM630 (3 mg/kg), 24 após a injeção i.pl. de CFA. Os camundongos foram tratados com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) 30 min após o tratamento com os antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Os animais foram sacrificados 3 ou 6 h após o tratamento com o composto e a pele da pata posterior direita e a porção lombar da medula espinhal foram removidas para posterior análise das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC ou ainda para avaliação indireta da migração de neutrófilos através do ensaio de mieloperoxidase.

Para comprovar a seletividade desses antagonistas, realizamos novos experimentos onde camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA foram tratados com o agonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA, na presença do antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 ou tratados com o agonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, JWH-133, na presença do antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251.

### **3.4.5. Administração intratecal do oligonucleotídeo anti-sense para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>:**

A fim de confirmar o envolvimento dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no efeito anti-hiperalgésico demonstrado pela  $\alpha,\beta$ -amirina, diferentes grupos de camundongos foram tratados com o oligonucleotídeo anti-sense (ODN-AS) (12,5  $\mu$ g/5  $\mu$ l) contra a região codificadora do receptor CB<sub>1</sub> (5'-GCCTGCTAGAATCGCATT-3') ou do receptor CB<sub>2</sub> (5'-CTGCTGAGCGCCCTGGAGAAGAAC-3'). A injeção foi realizada por via intratecal (i.t.), no espaço sub-aracnóide (L3-L5) em camundongos anestesiados com uma mistura inalatória de isoflurano (3%) e oxigênio (2%), 24 horas após a LPNC. O tratamento foi realizado por 3 dias consecutivos em intervalos de 12 horas entre as administrações. Os grupos controles receberam tratamento com o missense (ODN-MS; 5'-GCCTGCTAGAATCGCATT-3'). No final do terceiro dia de tratamento, 30 min após a última injeção i.t. de ODN-AS ou ODN-MS, os animais receberam o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.). A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada de 1 a 6 h após o tratamento com o composto  $\alpha,\beta$ -amirina.

### **3.5. Análise do limiar de resposta frente ao estímulo mecânico através do filamento de von Frey**

Para avaliar a hiperalgesia mecânica, os camundongos foram colocados individualmente em compartimentos individuais feitos de acrílico transparente (9 × 7 × 11 cm). Os compartimentos estavam localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral da pata traseira direita. Os animais foram

aclimatizados por pelo menos 30 min antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada da pata foi obtida através de 10 aplicações (duração de 1 s cada) do filamento de von Frey 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA) (Larson et al., 1985). Os estímulos foram realizados na superfície plantar da pata traseira direita do animal. O filamento 0,6 g, por produzir em média 15% de frequência de retirada da pata, foi utilizado durante todo o trabalho por ser considerado um valor adequado para a avaliação da hiperalgesia mecânica (Bortolanza et al., 2002). Com o objetivo de determinar o limiar de retirada da pata basal (B), todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação antes da injeção intraplantar de CFA e antes da LPNC.

### **3.6. Análise do limiar de sensibilidade térmica ao calor**

A técnica utilizada foi descrita por Hargreaves et al. (1988). Os camundongos foram colocados em uma câmara de acrílico com fundo e lados transparentes (Plantar Test, Ugo Basile, modelo 7371), onde permaneceram durante 30 minutos, por um período de 3 dias, antes do teste. Decorrido o tempo de adaptação dos animais ao ambiente, um feixe de luz previamente estabelecido de intensidade 25, foi incidido abaixo do fundo transparente e posicionado sob a pata posterior direita dos animais. A intensidade do feixe luminoso foi adequada para não causar a retirada da pata dos animais controle. A hiperalgesia térmica foi caracterizada como a retirada da pata dos animais dentro do tempo de 20 segundos. Para determinar o limiar térmico basal (B), todos os animais foram submetidos à avaliação antes da injeção i.pl. de CFA e antes do procedimento de LPNC. A hiperalgesia térmica foi avaliada em diferentes tempos após a injeção i.pl. de CFA ou após o procedimento de LPNC.

### **3.7. Análise do edema de pata**

O aumento de volume da pata dos camundongos foi medido com auxílio do pletismômetro (Ugo Basile). A diferença entre o volume das patas direita e esquerda foi quantificada (em  $\mu$ l) e tomada como índice de edema de acordo com a técnica descrita para medida em pletismômetro por Ferreira et al. (1978) e modificada para camundongos por Henriques et al. (1987). Todos os animais foram submetidos à avaliação do edema de pata antes (tempo 0) e em diferentes tempos após a injeção i.pl. de CFA.



### **3.8. Avaliação comportamental dos efeitos psicomiméticos de agonistas canabinóides**

A Tetrade é um conjunto de testes responsáveis por avaliar quatro principais alterações causadas pelo tratamento com agonistas canabinóides: hipotermia, analgesia, hipolocomoção e catalepsia (Pertwee, 1972; Fox *et al.*, 2001). Como o tratamento com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) demonstrou ação anti-hiperalgésica em modelos de dor persistente e sua ação depende da ativação do sistema canabinóide, grupos distintos de animais foram selecionados, tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) ou com os agonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> (ACEA; 10 mg/kg; i.p.) ou CB<sub>2</sub> (JWH-133; 10 mg/kg; i.p.) e avaliados nos testes descritos a seguir.

#### **3.8.1. Efeito sobre o desempenho motor (rota-rod)**

O desempenho motor dos camundongos tratados com o isômero  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) foi avaliado através do teste do rota-rod conforme a metodologia descrita anteriormente (Vaz *et al.*, 1996). O aparelho de rota-rod (Ugo Basile, modelo 7600) consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos divididos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro gira a uma velocidade constante de 22 rotações por minuto. Os camundongos foram treinados 48 e 24 h antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que não permaneceram 120 segundos no aparelho. Os animais foram avaliados quanto à atividade locomotora antes (tempo 0) e em tempos determinados (30, 60, 120 e 180 min) após a administração da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) ou após a administração dos agonistas seletivos dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> (ACEA; 10 mg/kg; i.p.) ou CB<sub>2</sub> (JWH-133; 10 mg/kg; i.p.). Os resultados foram expressos como tempo (s) em que os animais permaneceram sobre o aparelho.

#### **3.8.2. Temperatura corporal**

A temperatura corporal dos camundongos foi avaliada utilizando um termômetro digital (BD Basics USA). O mesmo foi lubrificado e inserido em uma profundidade de 2 cm no reto dos camundongos. A temperatura corporal foi obtida antes (tempo 0) e em tempos determinados (30, 60, 120 e 180 min) após o tratamento oral dos animais com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) ou após o tratamento intraperitoneal com os agonistas seletivos dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> (ACEA; 10 mg/kg) ou CB<sub>2</sub> (JWH-133; 10 mg/kg).

### 3.8.3. Limiar basal de sensibilidade térmica ao calor

Uma fonte radiante de calor (Tail-Flick Analgesia Meter, Ugo Basile, Italy) foi utilizada para avaliar a latência de retirada da cauda. Os animais foram posicionados sobre o aparato experimental e a porção da cauda situada a 2 cm da base foi exposta a um feixe de luz de intensidade 15. A latência de retirada da cauda foi definida como o intervalo de tempo, em segundos, que o camundongo levou para retirar a cauda do feixe luminoso. Todos os animais foram avaliados previamente para determinar o limiar térmico basal (tempo 0) e submetidos a análise 30, 60, 120 e 180 min após o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) ou após o tratamento intraperitoneal com os agonistas seletivos dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> (ACEA; 10 mg/kg) ou CB<sub>2</sub> (JWH-133; 10 mg/kg). Vinte segundos foram adotados como tempo máximo de reação para evitar possíveis danos teciduais (D'Amour e Smith, 1941).

### 3.8.4. Catalepsia

A catalepsia foi avaliada utilizando o teste da barra suspensa. Para isso as patas dianteiras dos camundongos foram apoiadas em uma barra horizontal (4,5 cm de altura por 0,5 cm de diâmetro) (Sanberg *et al.*, 1988). O tempo em que os animais se mantiveram imóveis e com suas patas sobre a barra foi avaliado durante 60 s. A catalepsia foi avaliada nos tempos de 0 (limiar basal) e em tempos determinados (30, 60, 120 e 180 min após o tratamento com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) ou após o tratamento com os agonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> (ACEA; 10 mg/kg; i.p.) ou CB<sub>2</sub> (JWH-133; 10 mg/kg; i.p.).

## 3.9. Quantificação do RNA mensageiro para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>

### 3.9.1. Extração do RNA total

Os camundongos foram submetidos à LPNC e 4 dias após a cirurgia foram tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.). Um grupo distinto de animais recebeu a injeção intraplantar de CFA e 24 h ou 4 dias após a injeção de CFA foram tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.). Seis horas após o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina ou veículo, os animais foram sacrificados por decapitação e o tecido da região lombar da medula espinhal (L3-L5) foi removida. A fim de verificar se a  $\alpha,\beta$ -amirina apresentaria algum efeito *per se* na expressão do mRNA, um grupo de animais distintos que não foram submetidos à LPNC e nem receberam a injeção i.pl. de CFA, foram tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30

mg/kg; v.o.) e 6 h após foram sacrificados por decapitação e a região lombar da medula espinhal e o córtex foram removidos.

A preparação das amostras foi realizada em condições livres de RNase. A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos em reagente de TRIzol® (1 ml de reagente para 100 mg de tecido) (Invitrogen, SP, Brazil), conforme recomendações do fabricante. Após a homogeneização com TRIzol® adicionou-se 200 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 15 min, 4 °C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual adicionou-se 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (10.000 rpm, 10 min, 4 °C), sendo o precipitado resultante re-suspenso em 1 mL de etanol 75% gelado. As amostras foram novamente centrifugadas (5.000 rpm, 5 min, 4 °C), o etanol desprezado e o precipitado, o qual contém o RNA foi dissolvido em água ultra pura. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas no aparelho NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). O RNA foi aliqotado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso.

### ***3.9.2. Confecção do DNA complementar (Reação de Transcrição Reversa)***

Após a extração do RNA, realizou-se a transcrição reversa do mRNA em DNA complementar (cDNA). Para a reação de transcrição reversa, 1 µL de cada amostra contendo 2 µg de RNA total foram incubadas com 1 µL de Oligo dT 15, 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM) e com água ultra pura para um volume final de 12 µL. Essas amostras foram aquecidas por 5 min a 65 °C, esfriadas por 5 min a 4 °C e acrescidas de 4 µL de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 mM, e 1 µL de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37 °C por 2 min e a enzima M-MLV (1µL, 200 U) foi adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 50 min e a inativação da reação foi realizada por incubação a 75 °C por 15 min. O cDNA foi estocado a 4 °C até a realização da reação de PCR em tempo real.

### **3.9.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real**

O cDNA foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com primers específicos para camundongos com marcação 3' quencher MGB e FAM, para o receptor CB<sub>1</sub> (Mm01212171\_s1), receptor CB<sub>2</sub> (Mm00438286\_m1), e GAPDH (Mm03302249\_g1), o qual foi utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 µL de cDNA (100 ng), 5 µL de reagente master mix, 0,5 µL de primer para o alvo específico CB<sub>1</sub> ou CB<sub>2</sub>, 0,5 µL de primer para GAPDH e 3,0 µL de água ultrapura, em um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 55 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método para  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para a quantificação relativa.

### **3.10. Ensaio de Imunohistoquímica**

#### **3.10.1. Preparo dos cortes histológicos e reativação antigênica**

Para o estudo de imunohistoquímica, diferentes grupos de camundongos foram submetidos à injeção intraplantar de CFA ou ao procedimento de LPNC. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 7% (10 ml/kg, i.p.) e perfundidos transcardiamente com salina fisiológica enriquecida com heparina (1000 U/ml), seguida de paraformaldeído 4% (PFA) em solução salina 0,9%. Para o preparo dos cortes histológicos, tanto a região lombar (L3-L5) da medula espinhal quanto o tecido da pata foram coletados e mantidos em PFA 4% por 24 horas e, posteriormente, mantidos em etanol 70%. Os tempos de coleta dos tecidos para posterior detecção dos fatores de transcrição p-CREB e p-p65 NF-κB foi de 6 horas após a injeção i.pl. de CFA e de 7 dias após o procedimento da LPNC. Para detecção da enzima COX-2, os tecidos foram coletados 24 horas após a injeção i.pl. de CFA ou 21 dias após o procedimento da LPNC. O processamento dos tecidos foi realizado através da desidratação por passagens sucessivas em etanol de concentrações crescentes (etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% e, finalmente, etanol absoluto) e em seguida dois banhos de xilol de 30 minutos, com a finalidade de tornar os tecidos translúcidos (etapa de clareamento ou diafanização). Quando os tecidos tornaram-se translúcidos foram colocados na parafina, na qual passaram por três banhos de 1 hora cada até o processo de inclusão (montagem do bloco e posicionamento do tecido).

A expressão da COX-2 e dos fatores de transcrição, p-CREB e p-p65 NF-κB, foi detectada em cortes histológicos confeccionados a

partir dos blocos de parafina contendo amostras da porção lombar da medula espinhal e da pele da pata de camundongos naïve, falso-operados, operados, CFA e tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30mg/kg). A expressão dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> foi detectada em cortes histológicos confeccionados a partir dos blocos de parafina contendo amostras da porção lombar da medula espinhal de camundongos naïve, falso operados, operados tratados com veículo e ODN-MS, operados tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina e ODN-MS, operados tratados com veículo e ODN-AS e operados tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina e ODN-AS. Os cortes teciduais de espessura de 5  $\mu$ m, realizados através da utilização de um micrótomo (Leica Co.) e posicionados sobre uma lâmina silanizada, foram mantidos em estufa a uma temperatura de 60-70 °C até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente, os tecidos foram desparafinados em xilol (xileno) e hidratados por passagens sucessivas em etanol absoluto. O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio 1,5% em metanol absoluto (v/v) por 20 min com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em paraformaldeído e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água Milli-Q e mantidas em banho-maria ajustado para 95 – 98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem, as lâminas foram submersas em PBS.

### 3.10.2. Detecção imunológica

A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos primários, tais como o anticorpo anti-CB<sub>1</sub> policlonal de coelho (1:500), o anticorpo anti-CB<sub>2</sub> policlonal de coelho (1:150), anticorpo anti-p-CREB policlonal de coelho (1:200), anticorpo anti-p-p65 policlonal de coelho (NF- $\kappa$ B) (1:100), e o anticorpo anti-COX-2 policlonal de coelho (1:500). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2 –

8 °C, durante 12 – 16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (1:250) anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (Em Vision Plus; Dako Cytomation) em câmara úmida durante 90 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens utilizando-se PBS por 5 min, em temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial (Dako Cytomation), através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3'-diaminobenzidina (DAB: 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetracloidrato) e 0,3 % de peróxido de hidrogênio em PBS. O tempo de incubação dos cortes com a solução cromógena foi padronizado em 8s, em seguida foram imersos em água destilada. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris seguida de um ligeiro banho com solução amoniacal. Após a contra-coloração, os cortes sofreram desidratação através de passagem das lâminas em etanol absoluto, diafanização em xilol e montagem em Entellan® (Merck, SP, Brasil). Além de utilizar um grupo naïve como controle negativo, em cada reação foi utilizado um controle negativo na ausência do anticorpo primário.

Os resultados foram registrados através da câmera digital (DS-5M-L1 Nikon) acoplada ao microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i) (ambos da Nikon, Melville, NY, USA), em aumento de 10X e 400x. As configurações para aquisição de imagem foram idênticas para todas as lâminas em todos os grupos experimentais, para o mesmo marcador. Quatro campos (aumento de 400x) foram capturados da região da derme da pata ou da região do corno dorsal da medula espinhal associada às terminações nervosas das fibras aferentes primárias. As imagens digitalizadas foram transferidas para o computador e a intensidade média de marcação, que difere a marcação do anticorpo da marcação inespecífica, foi determinada através do programa NIH ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, Maryland, EUA). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Para todas as análises, a intensidade total de pixels foi determinada, e os dados foram expressos como densidade óptica, utilizando o aumento de 400x. O método de imunohistoquímica utilizado neste estudo é extensivamente utilizado para detectar a expressão de proteínas em tecidos embebidos em parafina pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase.

### 3.11. Dosagem de Citocinas

Os níveis teciduais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC foram avaliados como descrito anteriormente (Campos et al., 2002) com poucas modificações. Resumidamente, o tecido das patas ou a região lombar da medula espinhal de camundongos foram removidos e homogeneizados em PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA sódico 10 mM, e aprotinina A 2 ng/mL. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -70 °C até o momento da análise. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos como a quantidade de citocina por miligrama de proteína da amostra. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se *Kits* específicos de ELISA (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*), de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.12. Atividade da Enzima Mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase foi realizada como indicativo do progresso da inflamação. Para esta análise, os tecidos da pata ou da região lombar da medula espinhal de camundongos foram removidos, limpos, homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (10 mM; pH 4,7) e centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 111  $\mu$ L de tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M; NaPO<sub>4</sub> 0,02 M; EDTA sódico 0,015 M; pH 7,4) ao qual foi adicionado 333  $\mu$ L de NaCl 0,2 % gelado e, após 30 segundos, 333  $\mu$ L de NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi outra vez suspenso em tampão 2 gelado (NaPO<sub>4</sub> 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); pH 5,4). As amostras obtidas foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria (36 °C), sendo esse procedimento repetido 3 vezes. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C, e 25  $\mu$ L do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da mieloperoxidase. A reação enzimática para análise da atividade da mieloperoxidase foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO<sub>4</sub> 80 mM e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3 mM. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 nm e os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

### 3.13. Ensaio de união específica (Binding)

O ensaio de união específica para os receptores canabinóides foi conduzido conforme previamente descrito por Ibrahim e colaboradores (2003) com pequenas modificações. As membranas foram preparadas com cérebro de rato, contendo receptores CB<sub>1</sub> e com baço de ratos, contendo os receptores CB<sub>2</sub>. Para a obtenção das membranas, os ratos foram sacrificados por decapitação e o cérebro e o baço foram cuidadosamente removidos e homogeneizados em tampão A gelado (pH de 7,4) contendo: 50 mM de Tris-HCl; 320 mM sacarose; 1 mM EDTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>. O homogeneizado foi primeiramente centrifugado por 10 minutos, 3.650 x g a 4 °C. O precipitado formado foi desprezado e o sobrenadante foi centrifugado a 18.000 rpm por 60 min, a 4 °C. O precipitado resultante foi resuspenso em 1 ml de tampão B gelado (pH 7,4), contendo: 50 mM de Tris-HCl; 1 mM EDTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>. A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Os experimentos foram realizados em duplicata, com volume final de 500 µl, em tampão C (pH de 7,4) contendo: 50 mM de Tris-HCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA, 100 µM PMSF; com 0,2% de albumina, contendo a preparação de membranas de cérebro ou de baço de ratos (50 µg/proteína) e 0,5 nM de [<sup>3</sup>H]SR141716A (receptor CB<sub>1</sub>) (atividade específica de 52 Ci/mmol) ou 0,8 nM de [<sup>3</sup>H]CP-55,940 (receptor CB<sub>2</sub>) (atividade específica de 147,9 Ci/mmol) na presença ou ausência de α,β-amirina ( $10^{-11} - 10^{-4}$ M) e do agonista não seletivo dos receptores canabinóides, WIN 55,212-2 (100 µM) para avaliação da união inespecífica. Após 60 min de incubação (30 °C), a reação foi interrompida por filtração. Os filtros foram previamente incubados com solução de polietilenoimina (0,1%) por um período mínimo de 2 h. Em seguida os filtros foram expostos a filtração a vácuo e então lavados com 1 ml de tampão C. As amostras foram então filtradas e, imediatamente após à filtração, foram lavadas por três vezes consecutivas com 1 ml de tampão C gelado. Após secagem, os filtros foram colocados em eppendorfs contendo 1 ml de líquido de cintilação, permanecendo em repouso por 24 horas, para posterior leitura no cintilador beta (Packard, modelo Tri-Carb 1600 TR). Os resultados foram normalizados com 0 e 100% da ligação específica do radioligante. Os dados foram obtidos em duplicata de 4 experimentos independentes.

### 3.14. Drogas e reagentes

O adjuvante Completo de Freund's (CFA), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Tween 20, aprotinina e a solução salina tamponada



com fosfato (PBS) foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Os agonistas canabinóides R-[2,3-diidro-5-metil-3(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3,-de]-1,4-benzoxazina-6-il]-1-naftalenila metanonea mesilato (WIN 55,212-2), (2-metil-1-propil-1H-indol-3-yl)-1-naftalenilmetanona (JWH-133, [N-(2-cloroetil)5,8,11,14-eicosaetraenamida] (ACEA), os antagonistas canabinóides N-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazole-3-carboxamida (AM251) e 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-metoxifenil)metanona (AM630) foram adquiridos da Tocris Bioscience (Missouri, USA).

O antisense oligodeoxinucleotídeo específico para o receptor CB<sub>1</sub> (ODN-AS, sequência 5'-GCCGTCTAAGATCGACTT-3'), CB<sub>2</sub> (ODN-AS, sequência 5'-CTGCTGAGCGCCCTGGAGAAC-3') e o controle negativo (ODN-MS, sequência 5'-GCCTGCTAGAATCGCATT-3') foram obtidos da Prodimol Biotecnologia (Belo Horizonte, Brazil).

O reagente TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), o Oligo dT, a enzima transcriptase reversa M-MLV, o dNTP, o DTT, o Tris-HCl e o RNAsin foram obtidos da Promega (Madison, WI, USA). O kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, a placa de reação óptica de 96 poços, os primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os receptores CB<sub>1</sub> (Mm01212171\_s1), receptor CB<sub>2</sub> (Mm00438286\_m1), e GAPDH (Mm03302249\_g1), foram todos procedentes da Applied Biosystems (São Paulo, Brasil).

Os anticorpos policlonais primários anti-CB<sub>1</sub> e anti-CB<sub>2</sub> são provenientes da Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Os anticorpos policlonais anti-p-CREB (Ser133) e anti-p-p65 NF-κB (Ser276) foram comprados da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) e o anti-corpo policlonal anti-COX-2 foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Os kits de ELISA para IL-1β, TNF-α e KC, para camundongos foram comprados da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). O kit de ELISA para IL-6 para camundongos foi comprado da Bioscience (San Diego, CA, USA).

O Isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil), hidrato de cloral (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), pastilhas de PBS, citrato de sódio, hematoxicilina de Harris, MgCl<sub>2</sub>, KCl, paraformaldeído, etanol, xilol, metanol, acetona, o entellan, dimetilsulfoxido (DMSO) e Tween 80 todos obtidos da Merck & Co. (Inc., Whitehouse Station, NJ, USA).

Streptavidina-horseradish peroxidase e o 3,3'-diaminobenzidine (DAB) obtidos da Dako (Glostrup, Denmark).

Os compostos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico, ácido oleanólico e betulina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

O radioligante [ $^3\text{H}$ ]CP-55,940 (atividade específica 147,9 Ci/mmol) foi adquirido da PerkinElmer (Massachusetts, USA) e o [ $^3\text{H}$ ]SR141716A (atividade específica 52 Ci/mmol) foi adquirido da Amersham Life Science (UK).

O triterpeno  $\alpha,\beta$ -amirina (mistura de 1:1) foi isolado da resina da espécie vegetal *Protium kleinii* como descrito anteriormente por Oliveira e colaboradores (1998), com o grau de pureza maior que 95%. Para a realização dos experimentos, o composto  $\alpha,\beta$ -amirina foi dissolvida em 5% de tween 80, 5% de etanol absoluto e 90% de PBS. Soluções estoque de WIN 55,212-2 foram preparadas com 100% de DMSO. Para atingir a concentração de WIN 55,212-2 desejada, foram adicionados 5% de tween 80 e 95% de PBS, sempre tomando o cuidado para que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 0,5%. Soluções estoque do agonista do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA, foram preparadas com 100% etanol e do agonista do receptor CB<sub>2</sub>, JWH-133, com 100% de Tocrisolve<sup>TM</sup> 100 (Tocris Bioscience). O antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 foi diluído em 5% de etanol e 95% de PBS e o antagonista do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 foi diluído em 5% de DMSO e 95% de PBS. Os grupos controles foram tratados com salina contendo a mesma quantidade do solvente utilizado para diluir as drogas.

### 3.15. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M., 95%) de 3-6 animais por grupo. As porcentagens de inibição citadas nos testes de análise comportamental foram calculadas como a média  $\pm$  E.P.M. da diferença (em porcentagem) entre as áreas sob as curvas obtidas. Para os demais testes avaliados, as porcentagens de inibição foram calculadas como a média  $\pm$  E.P.M. da diferença (em porcentagem). Todas as análises estatísticas foram realizadas para cada experimento individual em relação ao grupo controle correspondente. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, com medidas repetidas quando necessário. As análises foram complementadas pelo teste post-hoc de Bonferroni, quando adequado. O cálculo da CI<sub>50</sub> foi determinado pela análise de regressão não-linear de 4 experimentos independentes.

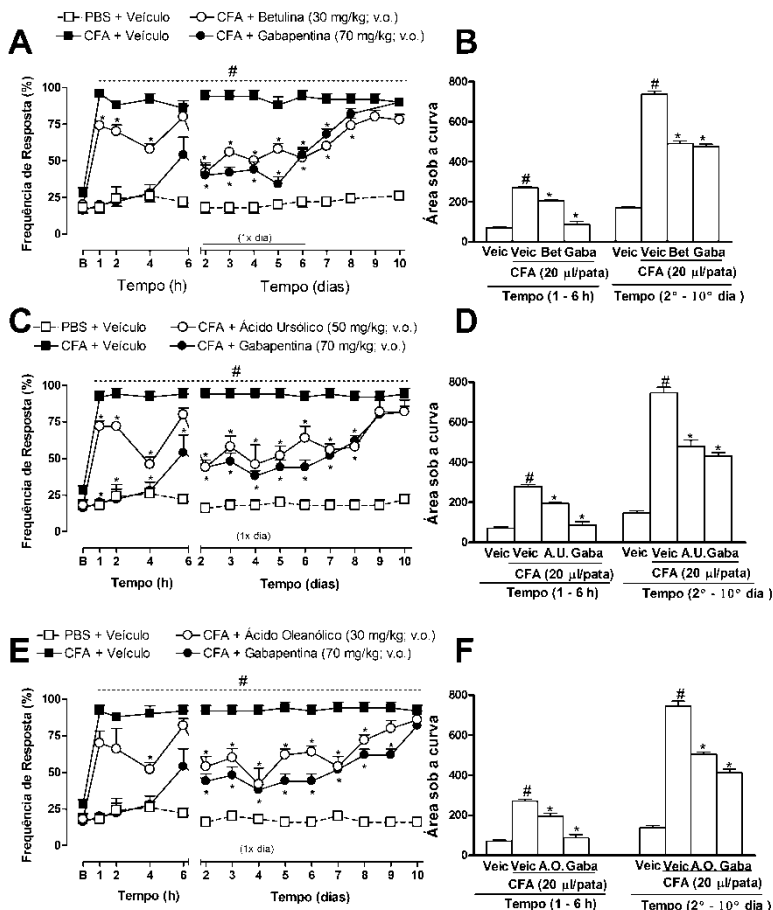
Valores de p menores que 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises citadas acima foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA). A constante de inibição ( $K_i$ ) dos compostos competidores foi calculada usando a equação de Cheng-Prusoff ( $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_D)$ ) (Cheng & Prusoff, 1973).

## 4. Resultados

### 4.1. Atividade anti-hiperalgésica dos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido oleanólico e ácido ursólico sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA e pela LPNC

A fim de avaliar a habilidade dos triterpenos pentacíclicos em inibir respostas hiperalgésicas persistentes, diferentes grupos de camundongos foram tratados com os compostos triterpenos pentacíclicos betulina (30 mg/kg; **Figura 2A**), ácido ursólico (50 mg/kg; **Figura 2C**) ou ácido oleanólico (30 mg/kg; **Figura 2E**), todos administrados 1 hora antes da injeção i.pl. de CFA. O pré-tratamento com os compostos triterpenos pentacíclicos betulina e ácido ursólico, diminuiu significativamente a hiperalgesia mecânica até 4 h após a injeção i.pl. de CFA, com inibições de 25% e 31%, (**Figuras 2 B e D**), respectivamente. Curiosamente, o tratamento com o ácido oleanólico reduziu a hiperalgesia mecânica, apenas na 4<sup>a</sup> hora após a injeção i.pl. de CFA (**Figura 2E**), com inibição de 38% (**Figura 2F**).

O tratamento oral com a gabapentina (70 mg/kg), utilizado como controle positivo, também foi eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA, semelhante aos resultados obtidos com os tratamentos com os triterpenos pentacíclicos (**Figura 2**). O tratamento diário (por 5 dias consecutivos) com os compostos betulina (**Figura 2A**), ácido oleanólico (**Figura 2C**) e ácido ursólico (**Figura 2E**) conferiu uma ação anti-hiperalgésica, quando avaliada diariamente, 3 h após cada tratamento, mesmo quando houve interrupção do tratamento. As inibições observadas foram de 34% para betulina (**Figura 2B**), 43% para o ácido ursólico (**Figura 2D**) e 33% para o ácido oleanólico (**Figura 2F**). Resultados semelhantes foram encontrados para o tratamento com a gabapentina.



**Figura 2:** Efeito dos triterpenos pentacíclicos na hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA. (A) betulina (30 mg/kg), (C) ácido ursólico (50 mg/kg) e (E) ácido oleanólico (30 mg/kg) foram administrados por via oral, 1 hora antes (tratamento agudo) ou do 2° ao 6° dia (tratamento prolongado), após a injeção i.pl. de CFA (20 µl/pata) e durante todo o tratamento prolongado, 3 h após cada tratamento. A hiperalgesia foi avaliada através da aplicação do filamento de Von Frey 0,6 g. (B, D e F) Área sob a curva dos tratamentos demonstrados nos Painéis A, C e E, respectivamente. A gabapentina (70 mg/kg), controle positivo, foi administrada seguindo o mesmo esquema de tratamento dos compostos. Cada ponto representa a média de 5-6 animais e as linhas verticais indicam  $\pm$  E.P.M. Os símbolos denotam diferença significativa: # $p < 0,05$  do grupo que recebeu injeção i.pl. de PBS e \* $p < 0,05$  do grupo tratado com veículo + CFA. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B (limiar de retirada da pata basal).

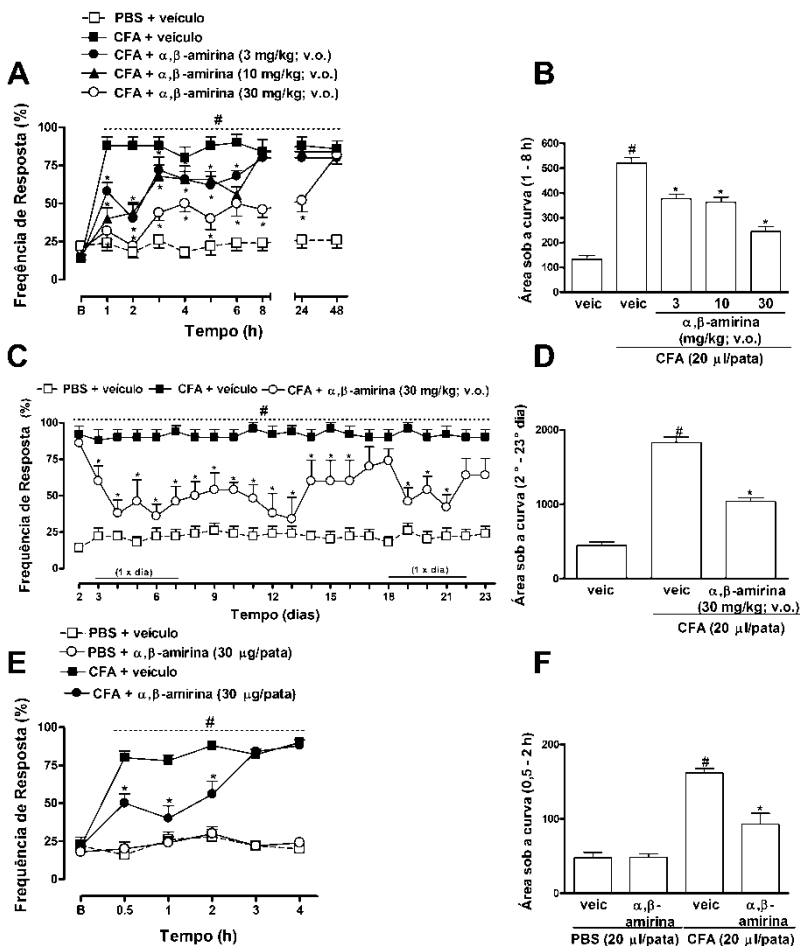
De maneira semelhante, o tratamento com os compostos triterpenos pentacíclicos betulina (30 mg/kg; **Figura 3A**), ácido ursólico (50 mg/kg; **Figura 3C**) ou com ácido oleanólico (30 mg/kg; **Figura 3E**), reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC, quando administrados no 4º dia após a cirurgia, por até 6 h após o tratamento, demonstrando uma inibição de 36%, 35% e 38%, conforme calculado pela AUC (**Figura 3B, D e F**, respectivamente). Além disso, quando realizado o tratamento prolongado com estes triterpenos pentacíclicos, por 5 dias consecutivos, obteve-se uma redução significativa da hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC (**Figura 3**), quando avaliada diariamente, sempre 3 h após cada tratamento, com inibições de 42% para betulina (**Figura 3B**), 37% para ácido ursólico (**Figura 3D**) e 68% para o ácido oleanólico (**Figura 3F**), perdurando por mais alguns dias após a interrupção dos tratamentos.



#### **4.2. Efeito anti-hiperalgésico e antiinflamatório da mistura de isômeros $\alpha,\beta$ -amirina sobre a resposta inflamatória e hiperalgésica induzida pela injeção i.pl. de CFA**

A injeção i.pl. de CFA induziu uma hiperalgesia mecânica de longa duração (por até 23 dias), caracterizada pelo aumento significativo na frequência de retirada da pata após estimulação mecânica com filamento de Von Frey (**Figura 4**). O pré-tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina nas doses de 3, 10 ou 30 mg/Kg (1 h antes da injeção i.pl. de CFA) foi eficaz em inibir significativamente a hiperalgesia mecânica até 24 h após a injeção i.pl. de CFA (**Figura 4A**). Apesar de todas as doses testadas no tratamento apresentarem inibição contra a hiperalgesia mecânica, os cálculos baseados na área sob a curva (AUC) revelam que este efeito não foi dose-dependente (**Figura 4B**). Entretanto, a dose de 30 mg/kg demonstrou maior inibição (69%) quando comparada as demais doses. O tratamento diário com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.), por 5 dias consecutivos, resultou em uma inibição prolongada da hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA (**Figura 4C**). O efeito anti-hiperalgésico manteve-se por 9 dias após a interrupção do tratamento. No 18º dia após a injeção de CFA, um novo tratamento foi re-iniciado (por mais 5 dias consecutivos) e novamente foi observada uma inibição significativa da hiperalgesia mecânica, descartando um possível efeito indutor de tolerância pelo composto (inibição total de 45%) (**Figura 4D**). Além disso, o tratamento local com  $\alpha,\beta$ -amirina (30  $\mu$ g/pata; i.pl.) administrado 24 h depois da injeção i.pl. de CFA foi eficaz em inibir a hiperalgesia mecânica até 2 h após o tratamento (**Figura 4E**), com inibição total de 26% (**Figura 4F**).

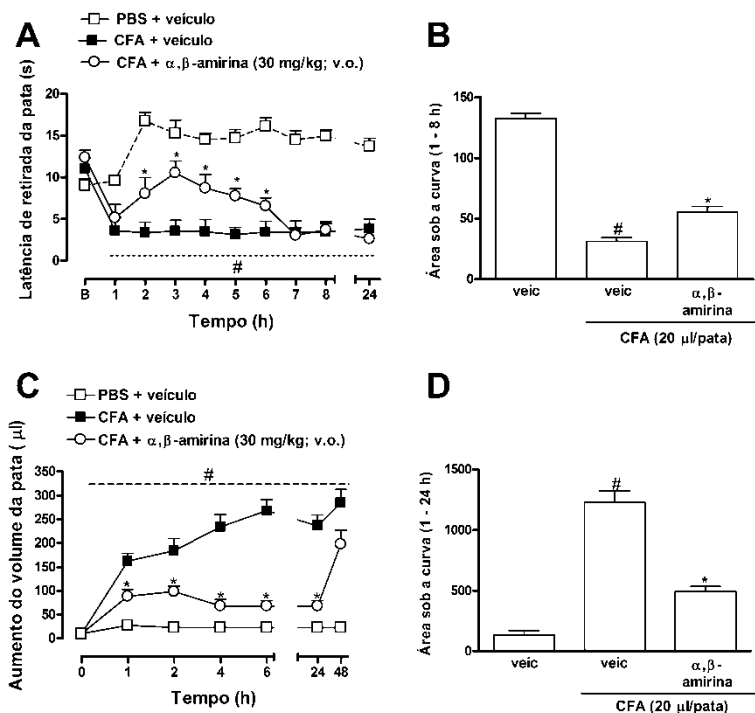




**Figura 4:** Efeito da  $\alpha, \beta$ -aminirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. **(A)** Diferentes doses de  $\alpha, \beta$ -aminirina (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) foram administradas 1 h antes de CFA (20  $\mu$ l/pata) e a avaliação da hiperalgesia mecânica foi iniciada 1 hora após. **(C)** Efeito do tratamento prolongado com  $\alpha, \beta$ -aminirina (30 mg/kg, v.o.). Camundongos foram tratados com  $\alpha, \beta$ -aminirina uma vez por dia, sempre três horas antes da avaliação do limiar mecânico. O tratamento foi realizado do 3° ao 7° dia após a injeção i.pl. de CFA e reiniciou no 18° até o 22° dia. **(E)** Tratamento local com  $\alpha, \beta$ -aminirina (30  $\mu$ g/pata) 24 h após a injeção de CFA. **(B, D, F)** Representam área sob a curva dos Painéis A, C e E, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5–6 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P. M). Os símbolos denotam diferença significativa: # $p < 0,05$  do grupo que recebeu injeção i.pl. de PBS e \* $p < 0,05$  do grupo tratado com veículo + CFA. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas se necessário. A análise foi seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. **B** (Limiar de retirada da pata basal).

Corroborando estes resultados, o pré-tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) foi capaz de aumentar em 52% o tempo de latência de retirada da pata na hiperalgesia térmica induzida pela injeção i.pl. de CFA. O efeito foi estatisticamente sigficante por até 6 h após a injeção de CFA (**Figura 5A**). A **Figura 5B** ilustra a área sob a curva dos resultados apresentados na figura 3 A.

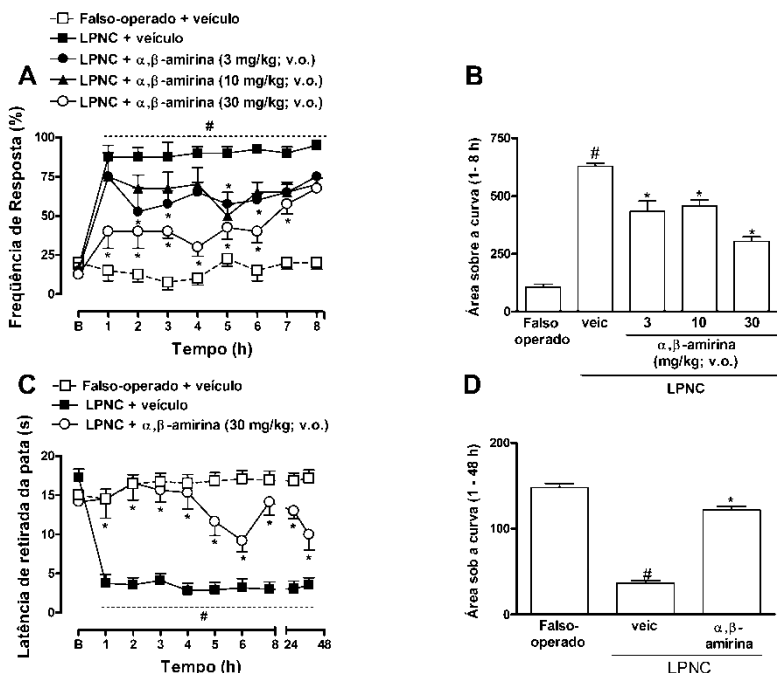
Além de um pronunciado e duradouro aumento na frequência de resposta à aplicação dos filamentos de Von Frey, a injeção i.pl. de CFA também foi capaz de induzir o edema na pata de camundongos (**Figura 5C**). O pré-tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.), administrado 1 h antes da injeção de CFA, inibiu significativamente o edema de pata por até 24 h após a injeção de CFA, com uma inibição de 53% (**Figura 5D**).



**Figura 5:** Efeito da  $\alpha,\beta$ -amirina sobre hiperalgesia térmica e edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de CFA em camundongos. **(A)** Camundongos foram tratados com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg, v.o.) 1 h antes da injeção de CFA e a hiperalgesia térmica foi avaliada pelo teste de Hargreaves 1 h após a injeção de CFA. **(C)** Efeito do tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) sobre o edema de pata induzido por CFA. **(B,D)** Representam área sob a curva dos painéis A e C, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5–6 animais e as linhas verticais indicam  $\pm$  E.P.M. Os símbolos denotam diferença significativa: # $p < 0,05$  do grupo que recebeu injeção i.pl. de PBS e \* $p < 0,05$  do grupo tratado com veículo + CFA. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. **B** (Limiar de retirada da pata basal).

### **4.3. Efeito do tratamento oral com a mistura de isômeros $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pela Ligação Parcial do Nervo Ciático**

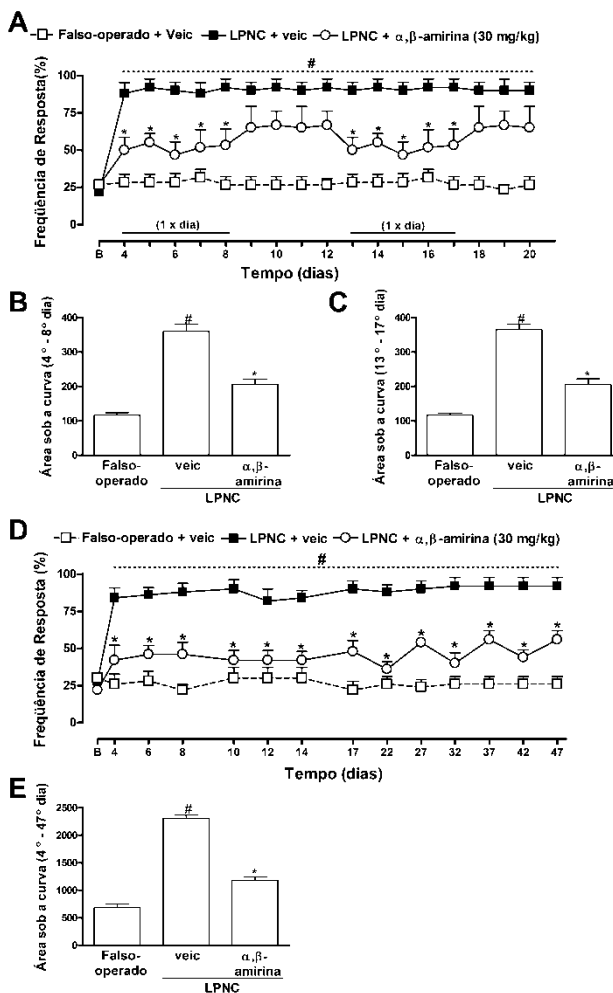
De maneira semelhante aos dados encontrados no modelo de CFA, o procedimento de LPNC produziu um quadro duradouro de hiperalgesia mecânica e térmica quando comparado ao grupo falso-operado (**Figura 6**). Quando administrada no 4º dia depois da cirurgia, a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (3, 10 e 30 mg/kg; v.o.) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC (**Figura 6A**). No entanto o efeito anti-hiperalgésico apresentado pela  $\alpha,\beta$ -amirina não é dose dependente (**Figura 6A**). Semelhante ao resultado encontrado no modelo de CFA, a dose de 30 mg/kg foi a mais efetiva em inibir a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC, demonstrando uma inibição total de 52% (**Figura 6B**). A inibição foi significativa em até 7 h após o tratamento. Esta mesma dose também demonstrou eficácia em inibir a hiperalgesia térmica induzida por LPNC durante todo o período avaliado (48 h) (**Figura 6C**), com inibição de 72%, de acordo com o cálculo da AUC (**Figura 6D**).



**Figura 6:** Efeito do tratamento com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela LPNC.  $\alpha,\beta$ -amirina ou veículo foram administrados no 4º dia após a cirurgia e avaliados quanto ao limiar mecânico (A) e térmico (C). (B) Área sob a curva referente ao Pannel A. (D) Área sob a curva referente ao Pannel C. A hipernocicepção mecânica foi avaliada utilizando filamentos de von Frey (0,6 g) e hipernocicepção térmica foi avaliada pelo teste de Hargreaves. Cada ponto representa a média de 5–6 animais e as linhas verticais indicam  $\pm$  E.P.M. Os símbolos denotam diferença significativa: # $p < 0,05$  do grupo falso-operado e \* $p < 0,05$  do grupo submetido à LPNC. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. **B** (Limiar de retirada da pata basal).

O tratamento prolongado com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.) realizado por 5 dias consecutivos reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC (**Figura 7A**), quando avaliada diariamente, sempre 3 h depois do tratamento (inibição de 60%; **Figura 7B**). Quando o tratamento foi interrompido a hiperalgesia mecânica se reestabeleceu rapidamente. O tratamento foi reiniciado no 13º dia após a cirurgia, por mais 5 dias consecutivos, e novamente foi observado a redução significativa da hiperalgesia mecânica (inibição de 65%; **Figura 7C**).

Além disso, o tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg), administrado 1 h antes da cirurgia, preveniu significativamente o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC (**Figura 7D**). Este efeito pôde ser observado durante todo o período do teste, com inibição de 83%, demonstrada pelo cálculo da área sob a curva (**Figura 7E**).



**Figura 7:** Efeito do tratamento preventivo e terapêutico com  $\alpha, \beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC. **(A)** Os animais receberam  $\alpha, \beta$ -amirina ou veículo, uma vez por dia (4° ao 8° dia) e novamente do 13° ao 17° dia e a hiperalgesia mecânica foi avaliada diariamente, 3 h após o tratamento. **(B e C)** Área sob a curva dos tratamentos demonstrados no painel A. **(D)** Efeito do tratamento preventivo (1 h antes da cirurgia) com  $\alpha, \beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC **(D)**. A hipernocicepção mecânica foi avaliada utilizando filamentos de von Frey (0,6 g). Cada ponto representa a média de 5–6 animais e as linhas verticais indicam  $\pm$  E.P.M. Os símbolos denotam diferença significativa: # $p < 0,05$  do grupo falso-operado e \* $p < 0,05$  do grupo submetido à LPNC. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. **B** (Limiar de retirada da pata basal).

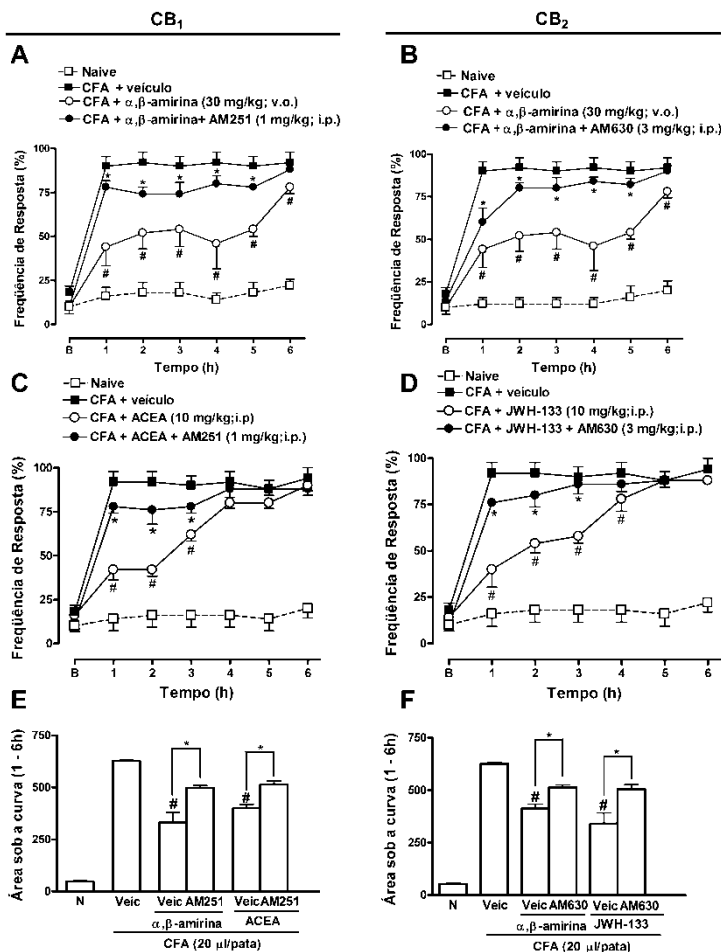
#### **4.4. Envolvimento dos receptores canabinóides na ação anti-hiperalgésica da $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA e pela LPNC**

Sabendo da interação dos receptores canabinóides em processos nociceptivos e inflamatórios e levando em consideração a marcada ação antiinflamatória e anti-hiperalgésica da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina nos modelos de dor crônica aqui avaliados, novos experimentos foram realizados para determinar se estes efeitos estariam relacionados com o sistema canabinóide.

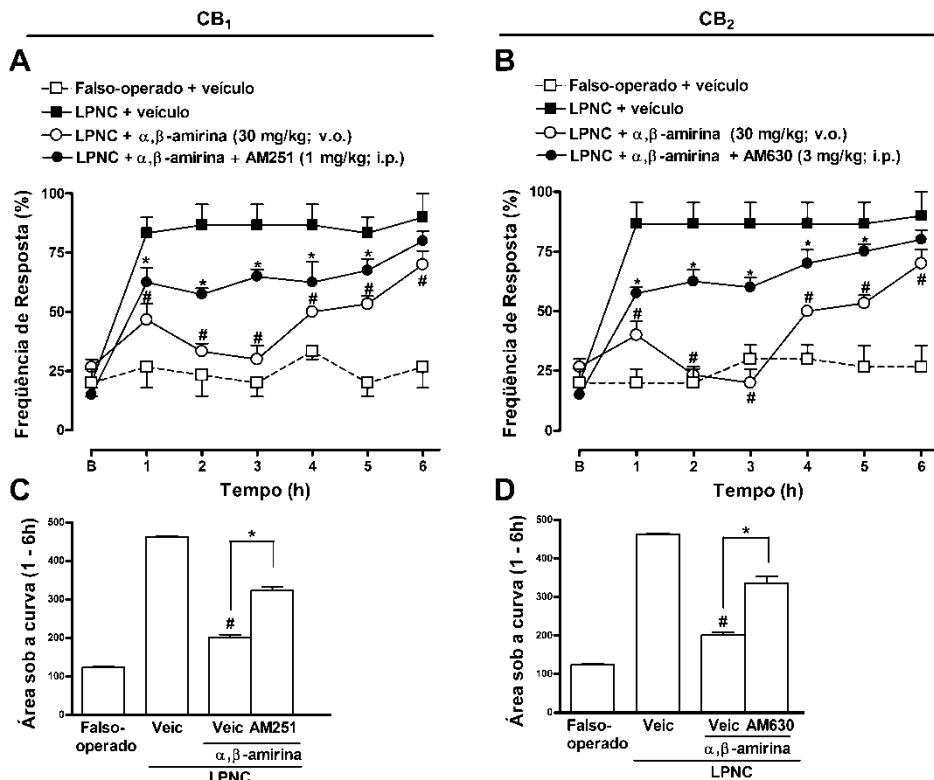
O tratamento prévio com o antagonista do receptor  $CB_1$ , AM251 (**Figura 8A e 8E**) ou com o antagonista do receptor  $CB_2$ , AM630 (**Figura 8B e 8F**) bloqueou significativamente o efeito anti-hiperalgésico demonstrado pela  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg, v.o.) em camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA. De maneira interessante, o efeito anti-hiperalgésico de  $\alpha,\beta$ -amirina foi semelhante ao efeito causado pelo agonista seletivo do receptor  $CB_1$ , ACEA (**Figuras 8C e 8E**) e do receptor  $CB_2$ , JWH-133 (**Figuras 8D e 8F**).

De maneira semelhante aos resultados encontrados no modelo de CFA, o pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor  $CB_1$ , AM251 (**Figura 9A e 9C**) ou com o antagonista seletivo para o receptor  $CB_2$ , AM630 (**Figura 9B e 9D**) preveniu significativamente o efeito anti-hiperalgésico da  $\alpha,\beta$ -amirina em camundongos submetidos à LPNC.





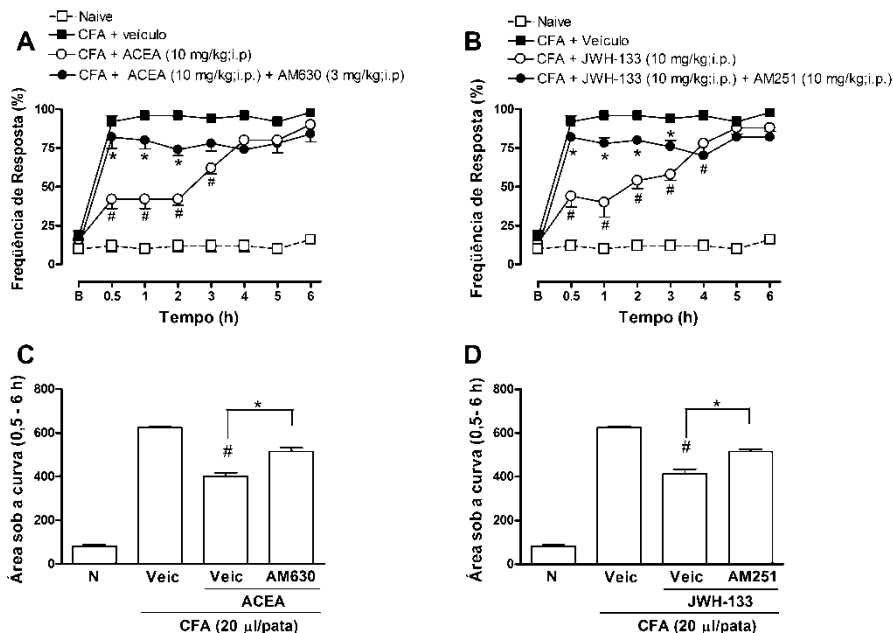
**Figura 8:** Evidência do envolvimento dos receptores canabinóides no efeito anti-hiperalgésico do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.p. de CFA. O antagonista do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (A) ou o antagonista do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 (B) foram administrados 24 h após a injeção de CFA. Trinta minutos após o tratamento com os antagonistas, os camundongos receberam  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg, v.o.). Efeito do agonista CB<sub>1</sub>, ACEA (C) ou agonista CB<sub>2</sub>, JWH-133 (D) na hiperalgesia induzida pela injeção i.p. de CFA. Pannel E representa a área sob a curva de A e C. Pannel F representa a área sob a curva de B e D. Cada ponto representa a média de 5–6 animais e as linhas verticais indicam  $\pm$  E.P.M. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo CFA e \*  $p < 0,05$  do grupo tratado com  $\alpha,\beta$ -amirina ou agonista CB<sub>1</sub>R ou agonista CB<sub>2</sub>R. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B (Limiar de retirada da pata basal).



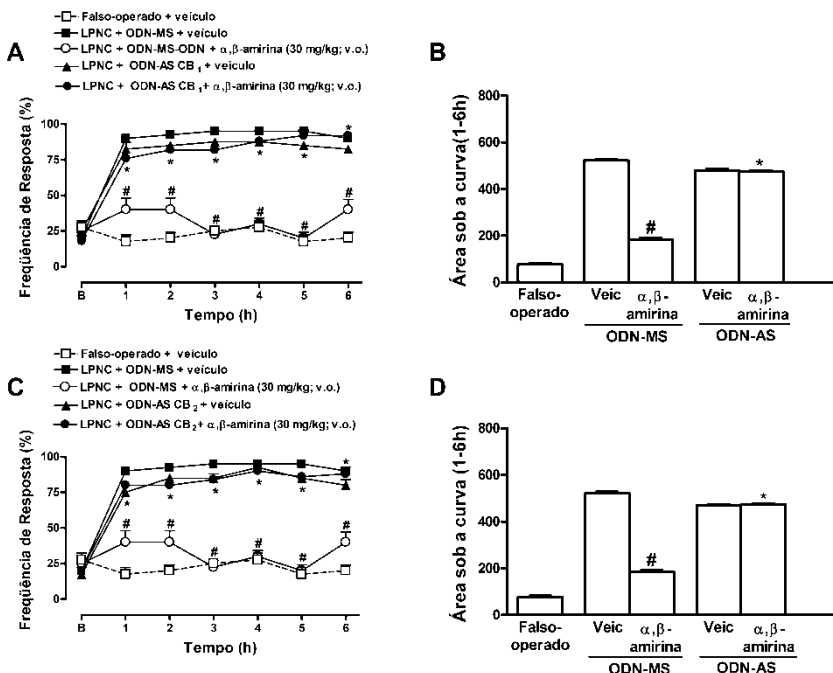
**Figura 9:** Evidência do envolvimento dos receptores canabinóides no efeito anti-hiperalgésico causado pela  $\alpha, \beta$ -amirina sobre a hiperalgisia mecânica induzida pela LPNC. O antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (**A**) ou antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 (**B**) foram administradas no 4º dia após a cirurgia.  $\alpha, \beta$  amirina (30 mg/kg, v.o.), foi administrada 30 minutos após o tratamento com antagonistas. Painéis **C** e **D** representam a área sob a curva do painéis **A** e **B**, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5-6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo LPNC e \*  $p < 0,05$  do grupo tratado com  $\alpha, \beta$ -amirina. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. **B** (Limiar de retirada da pata basal).

Devido ao fato dos tratamentos com os antagonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> terem exibido um efeito semelhante no bloqueio da ação anti-hiperalgésica de  $\alpha,\beta$ -amirina, e para comprovar, de fato, a seletividade desses antagonistas, realizamos novos experimentos onde camundongos submetidos a injeção i.pl. de CFA foram tratados com o agonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA juntamente com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 (**Figura 10A e C**). Outro grupo de camundongos foi tratado com o agonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub>, JWH-133 juntamente com o antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (**Figura 10B e D**). De fato os antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, aqui testados, não apresentaram completa seletividade, pois o tratamento com o antagonista do receptor CB<sub>1</sub>, AM251, reverteu parcialmente o efeito anti-hiperalgésico do agonista CB<sub>2</sub>, JWH-133. Da mesma maneira, o tratamento com o antagonista do receptor CB<sub>2</sub>, AM630, preveniu parcialmente o efeito do agonista do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA.

A falta de seletividade pode ser atribuída tanto aos antagonistas quanto aos agonistas dos receptores canabinóides. A fim de evitar erros de interpretação, realizamos experimentos adicionais com o emprego de oligonucleotídeos antisense (ODN-AS) para ambos os receptores canabinóides em camundongos submetidos à LPNC. A inibição da expressão do gene tanto para o receptor CB<sub>1</sub> (**Figura 11A e 11B**) quanto para o receptor CB<sub>2</sub> (**Figura 11C e 11D**) bloqueou totalmente o efeito anti-hiperalgésico da  $\alpha,\beta$ -amirina em camundongos submetidos à LPNC, confirmando assim que ambos os receptores são essenciais para que a  $\alpha,\beta$ -amirina exerça sua ação anti-hiperalgésica.

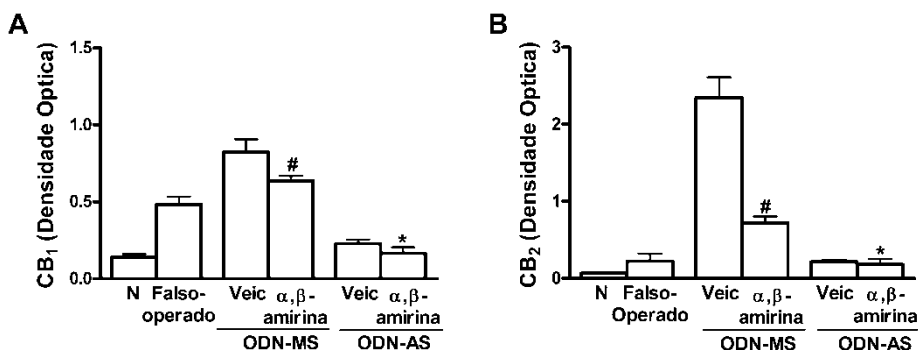


**Figura 10:** Seletividade dos antagonistas canabinóides. Para comprovar a seletividade do antagonista dos receptores canabinóides, camundongos foram tratados com o antagonista do receptor CB<sub>1</sub>, AM251 (**A**) ou com o antagonista do receptor CB<sub>2</sub>, AM630 (**B**), 24 h após a injeção i.p.l. de CFA. Trinta minutos após o tratamento com os antagonistas, os camundongos que receberam AM251 (CB<sub>1</sub>) foram tratados com o agonista do receptor CB<sub>2</sub>, JWH-133 e os camundongos que receberam AM630 (CB<sub>2</sub>) foram tratados com o agonista do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA. Os Painéis **C** e **D** representam a área sob a curva do painéis **A** e **B**, respectivamente. Cada ponto representa a média de 5-6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo CFA e \*  $p < 0,05$  do grupo tratado com antagonistas dos receptores canabinóides. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. **B** (Limiar de retirada da pata basal).



**Figura 11:** Efeito do bloqueio da expressão dos genes dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no efeito anti-hiperalgésico da α,β-amirina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela LPNC. ODN-AS (12,5 µg/5 µl) foi administrado por via intratecal (i.t.) duas vezes por dia (12 h/ 12 h). O tratamento iniciou 24 h após a LPNC e se estendeu por 3 dias consecutivos. Efeito da α,β- amirina (30 mg/kg; v.o.) na hipernocicepção mecânica, frente ao gene Knockdown para o receptor CB<sub>1</sub> (A) e para o receptor CB<sub>2</sub> (C). Painéis (B) e (D) representam a área sob a curva de (A) e (C) respectivamente. Cada ponto representa a média de 5-6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, com medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Diferença significativa é definida pelos símbolos e #p <0,05 do grupo tratado com ODN-MS + veículo e submetido à LPNC e \*p <0,05 do grupo tratado com ODN-MS + α,β-amirina. B (Limiar de retirada da pata basal). Veic (veículo). ODN-AS (Oligonucleotídeo Anti-sense). ODN-MS (Oligonucleotídeo Mis-match).

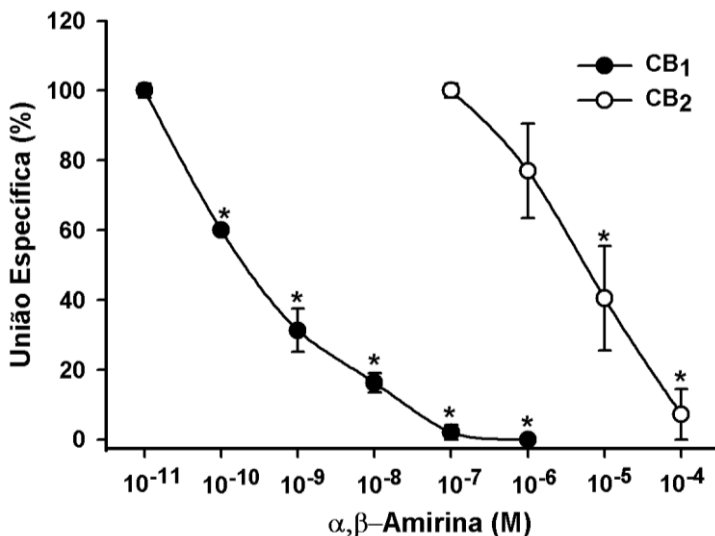
O ensaio de imuno-histoquímica confirmou a redução da expressão da proteína dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no corno dorsal da medula espinhal dos animais submetidos ao tratamento com ODN-AS. Em comparação ao grupo controle (tratado apenas com ODN-MS) o tratamento com ODN-AS diminuiu em 76% a expressão do receptor CB<sub>1</sub> e em 97% a expressão do receptor CB<sub>2</sub>. Curiosamente, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina impediu o aumento da expressão da proteína do receptor CB<sub>1</sub> (30%; **Figura 12A e anexo I**) e do receptor CB<sub>2</sub> (80%; **Figura 12B e anexo I**) no corno dorsal da medula espinhal de camundongos submetidos à LPNC.



**Figura 12:** Efeito do tratamento com ODN-AS na expressão da proteína do receptor CB<sub>1</sub> e do receptor CB<sub>2</sub> na medula espinhal de camundongos após LPNC. O tratamento com ODN-AS (12,5  $\mu$ g/5  $\mu$ l) para o receptor CB<sub>1</sub> (**A**) ou para o receptor CB<sub>2</sub> (**B**) reduziu a expressão desses receptores na porção lombar da medula espinhal após a LPNC. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina aumentou a expressão da proteína do receptor CB<sub>1</sub> e do receptor CB<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média de 3-6 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Diferença significativa é definida pelos símbolos <sup>#</sup>*p* < 0,05 para o grupo tratado falso operado e <sup>\*</sup>*p* < 0,05 do grupo tratado com ODN-MS + veículo e submetido à LPNC. **B** (Limiar de retirada da pata basal). **Veic** (veículo). **ODN-AS** (Oligonucleotídeo Anti-sense). **ODN-MS** (Oligonucleotídeo Mis-match).

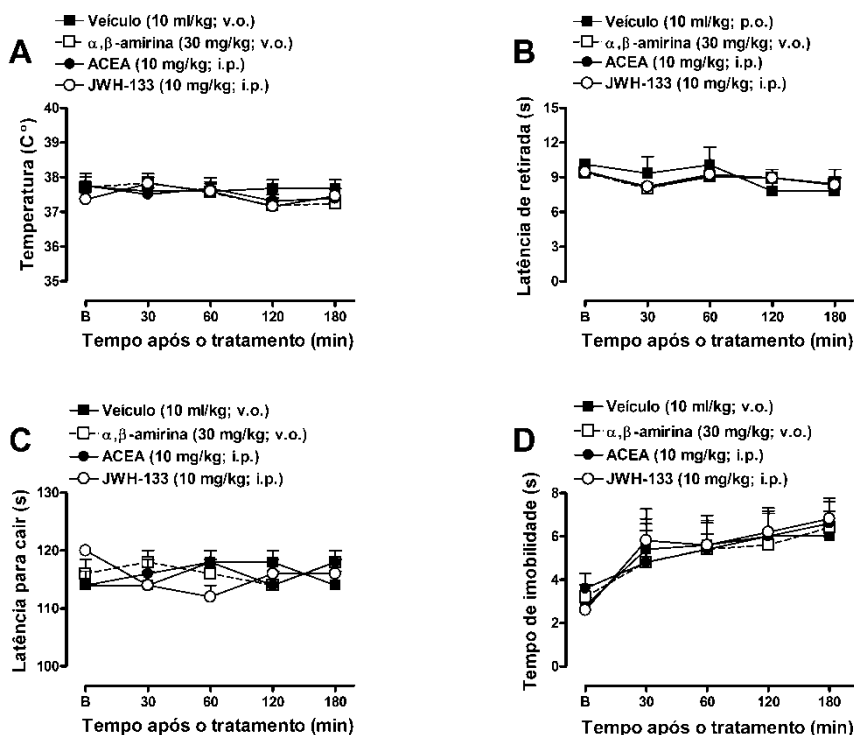
#### 4.5. Efeito da $\alpha,\beta$ -amirina no ensaio de ligação específica para [ $^3\text{H}$ ]-SR141716A (CB<sub>1</sub>) e [ $^3\text{H}$ ] CP-55,940 (CB<sub>2</sub>)

A  $\alpha,\beta$ -amirina causou deslocamento, concentração dependente, da ligação específica para o [ $^3\text{H}$ ]-SR141716A (receptor CB<sub>1</sub>) em membranas de cérebro de rato e para o [ $^3\text{H}$ ]-CP-55,940 (receptor CB<sub>2</sub>) em membranas de baço de rato (**Figura 13**). De maneira interessante, a  $\alpha,\beta$ -amirina apresentou uma afinidade muito maior pelo receptor CB<sub>1</sub> do que pelo receptor CB<sub>2</sub>. A mistura racêmica de  $\alpha,\beta$ -amirina apresentou uma constante de inibição  $K_i = 0.133 \text{ nM}$  [ $\text{IC}_{50} = 0,55 (0.18-1.64) \text{ nM}$ ] para o receptor CB<sub>1</sub> e  $K_i = 1.989 \text{ nM}$  [ $\text{IC}_{50} = 6,07 (2,63-13,97) \mu\text{M}$ ] para o receptor CB<sub>2</sub>. Estes resultados mostram que a  $\alpha,\beta$ -amirina tem cerca de 15.000 vezes, ligação preferencial para o receptor CB<sub>1</sub> do que para o receptor CB<sub>2</sub>.



**Figura 13:** Efeito da  $\alpha,\beta$ -amirina no ensaio de ligação específica do radioligante de receptor CB<sub>1</sub> [ $^3\text{H}$ ]-SR141716A (0,5 nM) ou CB<sub>2</sub> [ $^3\text{H}$ ] CP-55,940 (0,8 nM) a partir de preparações de membrana de cérebro ou baço de ratos, respectivamente. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M de 4 experimentos independentes em duplicatas. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os asteriscos denotam a diferença significativa \* $p < 0,05$  na ausência de  $\alpha,\beta$ -amirina.

**4.6. Avaliação dos efeitos psicomiméticos após tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina** O tratamento oral com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) não foi capaz de causar hipotermia (**Figura 14A**), analgesia basal (**Figura 14B**), hipolocomotividade (**Figura 14C**) ou catalepsia (**Figura 14D**), os quais são efeitos comuns de agonistas do receptor CB<sub>1</sub> sobre o sistema nervoso central. De maneira similar, os tratamentos com os agonistas canabinóides do receptor CB<sub>1</sub>, ACEA ou receptor CB<sub>2</sub>, JWH-133, em doses que foram anti-hiperalgésicas (10 mg/kg; i.p.) também não alteraram os parâmetros avaliados no ensaio da tétrede.



**Figura 14: Efeito do tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre os testes comportamentais na TÊTRADE.** A temperatura corporal (A), o teste de retirada da cauda (tail-flick) (B), a performance motora (rota-rod) (C) e a catalepsia (D) foram avaliados antes (B, basal) e em determinados tempos (30, 60, 120 e 180 min) após o tratamento oral dos camundongos com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg). Cada ponto representa a média de 5-6 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, com medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.



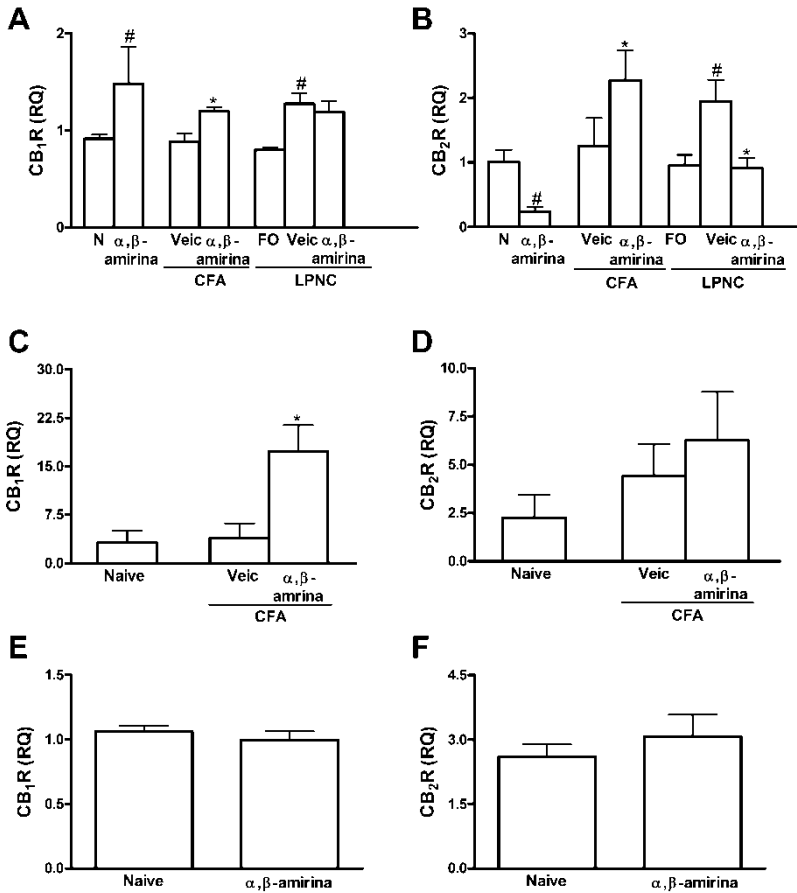
#### 4.7. Expressão do mRNA para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na medula espinhal de camundongos após a injeção i.pl. de CFA ou LPNC

Neste experimento avaliou-se o papel do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão do mRNA para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Os mRNA de ambos os receptores estavam constitutivamente expressos na região lombar da medula espinhal.

A injeção i.pl. de CFA não alterou significativamente a expressão do mRNA dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> em 24 horas (**Figura 15A e B**) ou 4 dias (**Figura 15B e C**) após o tratamento. De forma interessante, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg, v.o.) resultou em um aumento significativo da expressão do mRNA dos receptores CB<sub>1</sub> (**Figura 15A**) e CB<sub>2</sub> (**Figura 15B**) em animais submetidos a injeção i.pl. de CFA.

Ao contrário dos resultados encontrados no modelo de CFA, os camundongos submetidos à LPNC apresentaram um considerável aumento da expressão do mRNA de ambos os receptores (**Figura 15A e B**), quando avaliado 4 dias após a LPNC. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg, v.o) impediu o aumento da expressão do mRNA para o receptor CB<sub>2</sub>, mas não afetou a super expressão do receptor CB<sub>1</sub>. Quando em ausência de lesão, o tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina “per se”, causou aumento significativo na expressão de mRNA do receptor CB<sub>1</sub> e diminuiu a expressão do mRNA do receptor CB<sub>2</sub> na região lombar da medula espinhal (**Figura 15A e B**).

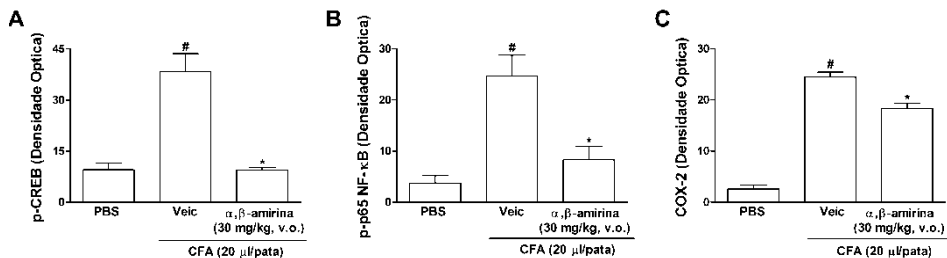
De forma diferente, o tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg) não alterou os níveis de mRNA dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> no córtex de animais saudáveis (**Figura 15D e 15E, respectivamente**), demonstrando que o tratamento oral não causa alterações em centros supra-espinhais.



**Figura 15: Expressão do mRNA para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na medula espinal e no córtex de camundongos.** O mRNA foi quantificado na porção lombar da medula espinal para os receptores CB<sub>1</sub> (A e C) e CB<sub>2</sub> (B e D) 24 h após a injeção i.pl. de CFA ou no 4º dia após a LPNC. A expressão do mRNA também foi avaliada 4 dias após a injeção i.pl. de CFA (C e D) e em animais saudáveis tanto na porção lombar da medula espinal (A e B) quanto no córtex (E e F) de camundongos, 6 h após o tratamento oral com α,β-amirina. O mRNA do GAPDH foi utilizado como controle endógeno para normalização. Cada coluna representa a média de 3 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa: # *p* < 0,05 do grupo naive (N) ou falso operado (FO) e \* *p* < 0,05 do grupo tratado com veículo (Veic) submetido à injeção de CFA ou à LPNC.

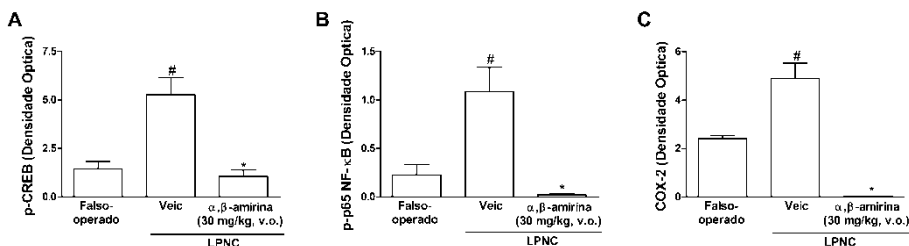
#### **4.8. $\alpha,\beta$ -amirina inibe a ativação dos fatores de transcrição CREB e NF- $\kappa$ B e a expressão da enzima COX-2 induzidos pela injeção i.pl. de CFA ou pela LPNC**

A injeção i.pl. de CFA ocasionou ativação acentuada dos fatores de transcrição CREB e NF- $\kappa$ B na pata de camundongos, quando avaliado 6 h após a injeção de CFA e na porção lombar da medula espinhal, quando avaliado 7 dias após LPNC. Estes eventos foram acompanhados pelo aumento da expressão da enzima COX-2 na pata de camundongos 24 h após a injeção de CFA e na porção lombar da medula espinhal 21 dias após LPNC. Os tempos de avaliação foram todos selecionados com base no pico de ativação de cada marcador, os quais foram determinados anteriormente em nosso laboratório. Além disso, a ativação do CREB e do NF- $\kappa$ B, bem como o aumento da expressão da enzima COX-2 foram inibidos significativamente pelo tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg), ambos quando avaliados na pata ou na porção lombar da medula espinhal de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA ou à LPNC, respectivamente. As inibições observadas foram de 100% para CREB (**Figura 16A**), 78% para NF- $\kappa$ B (**Figura 16B**) e 28% para a COX-2 (**Figura 16C**), quando avaliados na região da derme da pata posterior de camundongos submetidos à injeção i.pl. de CFA. As imagens ilustrativas das imunoistoquímicas realizadas nas células da derme das patas de camundongos, podem ser observadas no **Anexo II**.



**Figura 16:** Efeito da  $\alpha,\beta$ -amirina na ativação dos fatores de transcrição CREB e NF- $\kappa$ B e na up-regulação da enzima COX-2 induzida pela injeção de CFA. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina ou veículo foi realizado 1 h antes da injeção de CFA. O ensaio de imunistoquímica foi realizado na pele da pata dos camundongos 6 h após a injeção de CFA para CREB (A) e para NF- $\kappa$ B (B) e 24 h após para COX-2 (C). Cada coluna representa a média de 3 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo PBS e \*  $p < 0,05$  do grupo tratado com veículo (veic) submetido à injeção de CFA.

As inibições observadas na porção lombar da medula espinal de camundongos submetidos à LPNC foram de 100% para CREB (Figura 17A), 100% para NF- $\kappa$ B (Figura 17B) e 100% para a COX-2 (Figura 17C). As imagens ilustrativas das imunistoquímicas realizadas nas células do corno dorsal da medula espinal de camundongos, podem ser observadas no Anexo 3.



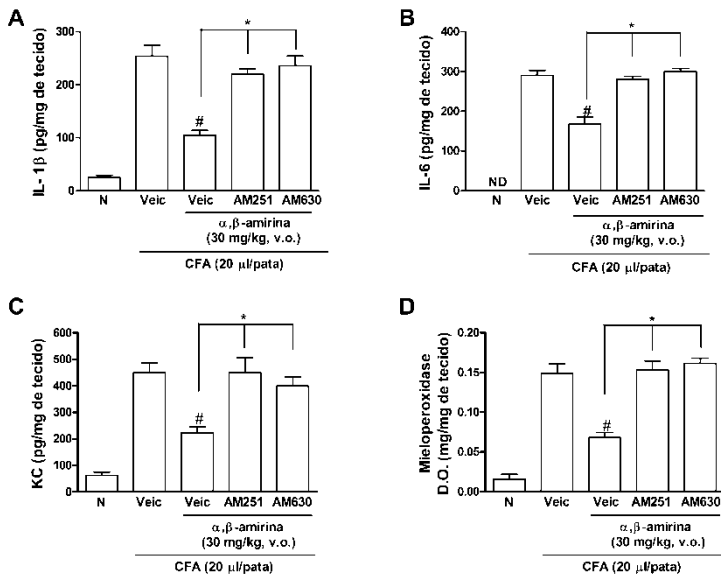
**Figura 17:** Efeito da  $\alpha,\beta$ -amirina na ativação dos fatores de transcrição CREB e NF- $\kappa$ B e na up-regulação da enzima COX-2 induzida pela LPNC. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina foi realizado 1 h antes da cirurgia. O ensaio de imunistoquímica foi realizado no corno dorsal da região lombar da medula espinal de camundongos 7 dias após a cirurgia para CREB (A) e para NF- $\kappa$ B (B) e 21 dias após para COX-2 (C). Cada coluna representa a média de 3 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo falso operado e \*  $p < 0,05$  do grupo tratado com veículo (veic) submetido à LPNC.

#### **4.9. $\alpha,\beta$ -amirina reduz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e a atividade da mieloperoxidase induzidos pela injeção i.pl. de CFA e após a LPNC**

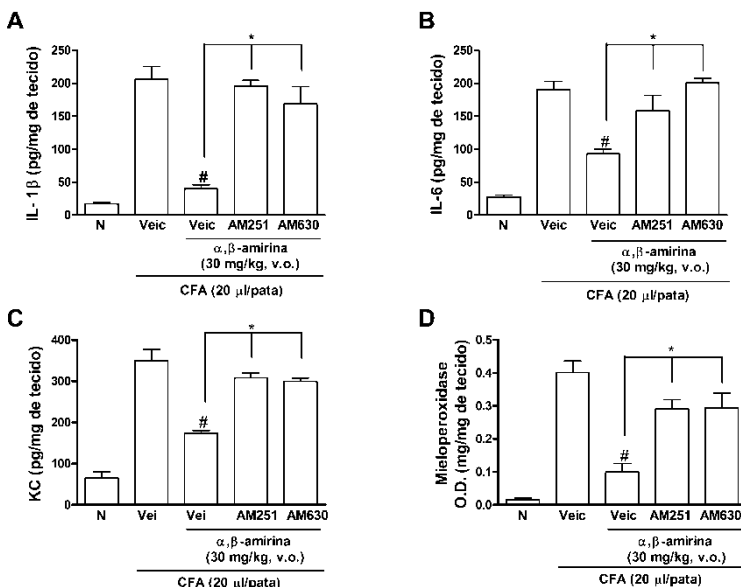
A injeção i.pl. de CFA induziu aumento significativo nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e na atividade da mieloperoxidase tanto na pata, quanto na porção lombar da medula espinhal de camundongos, 6, 6, 3 e 6 h após a injeção de CFA, respectivamente. Estes tempos foram escolhidos com base em experimentos preliminares em função do pico para cada um desses alvos. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg; v.o.), administrado 30 min antes da injeção i.pl. de CFA, preveniu significativamente o aumento dos níveis dessas citocinas pró-inflamatórias na pata de camundongos, 65% para a IL-1 $\beta$  (**Figura 18A**), 42% para IL-6 (**Figura 18B**), 58% para KC (**Figura 18C**) e em 61% para a atividade da mieloperoxidase (**Figura 18D**).

Além disso, o tratamento oral com a  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg), inibiu o aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias quando avaliados na região lombar da medula espinhal, com inibições de 88% para a IL-1 $\beta$  (**Figura 19A**), 60% de IL-6 (**Figura 19B**), 62% para KC (**Figura 19C**) e em 78% para a atividade da mieloperoxidase (**Figura 19D**).

A fim de verificar o possível envolvimento dos receptores canabinóides no efeito antiinflamatório demonstrado pela  $\alpha,\beta$ -amirina, os camundongos foram pré-tratados com antagonistas seletivos para o receptor CB<sub>1</sub> (AM251, 1 mg/kg, i.p.) ou para o receptor CB<sub>2</sub> (3 mg/kg, i.p.). O tratamento com os antagonistas dos receptores canabinóides foi capaz de bloquear o efeito inibitório da  $\alpha,\beta$ -amirina sobre as citocinas estudadas e sobre a atividade da mieloperoxidase, quando avaliados tanto na pata (**Figura 18A-D**) quanto na porção lombar da medula espinhal (**Figura 19A-D**), após a injeção i.pl. de CFA.



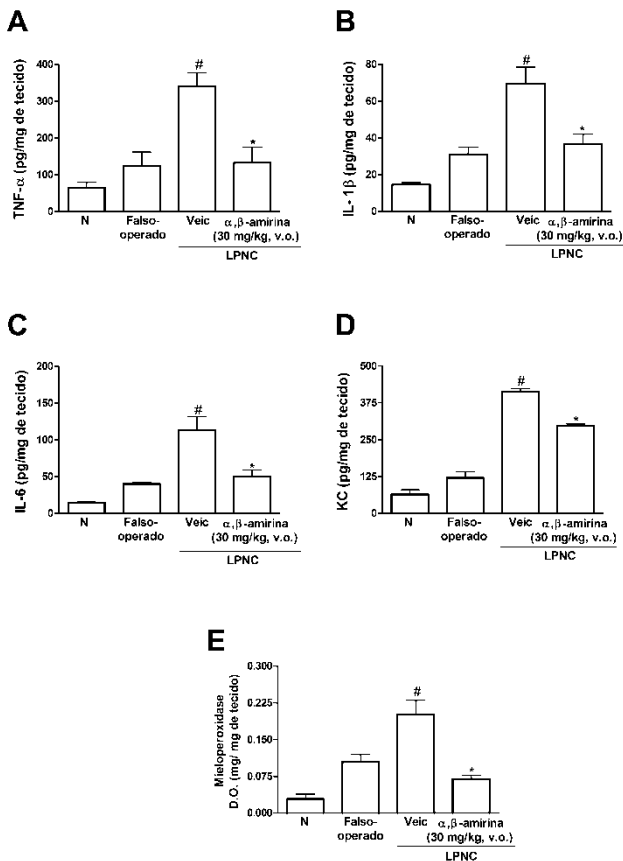
**Figura 18:** Papel dos receptores canabinóides no efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -aminirina na pata de camundongos. O tratamento com os antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub>, AM251 (1 mg/kg; i.p.) ou CB<sub>2</sub>, AM630 (3 mg/kg; i.p.) foi realizado 30 min antes do tratamento com  $\alpha,\beta$ -aminirina (30 mg/kg; v.o.). Os níveis de IL-1 $\beta$  (A; 6 h após CFA), IL-6 (B; 6 h após CFA) e KC (C; 3 h após CFA) e a atividade da mieloperoxidase (D; 6 h após CFA) foram avaliados na região subcutânea da pata após a injeção i.pl. de CFA. Cada coluna representa a média de 4 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo CFA + veículo (Veic) e \*  $p < 0,05$  do grupo CFA +  $\alpha,\beta$ -aminirina. N=naive; veic=veículo.



**Figura 19:** Papel dos receptores canabinóides no efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina na medula espinhal de camundongos. O tratamento com os antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub>, AM251 (1 mg/kg; i.p.) ou CB<sub>2</sub>, AM630 (3 mg/kg; i.p.) foi realizado 30 min antes do tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg;v.o). Os níveis de IL-1 $\beta$  (**A**; 6 h após CFA), IL-6 (**B**; 6 h após CFA) e KC (**C**; 3 h após CFA) e a atividade da mieloperoxidase (**D**; 6 h após CFA) foram avaliados na região lombar da medula espinhal de camundongos após a injeção i.pl. de CFA. Cada coluna representa a média de 4 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo CFA + veículo (Veic) e \*  $p < 0,05$  do grupo CFA +  $\alpha,\beta$ -amirina.

O procedimento da LPNC causou aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  (4 h após a cirurgia), IL-1 $\beta$  (7 dias após a cirurgia), IL-6 (3 dias após a cirurgia) e KC (6 h após a cirurgia) bem como a atividade da mieloperoxidase (4 dias após a cirurgia) na porção lombar da medula espinhal, quando comparados com camundongos naïve. Estes tempos de avaliação foram escolhidos com base em experimentos preliminares (curva tempo-resposta). O tratamento dos camundongos com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg, v.o.), 1 h antes da cirurgia, bloqueou significativamente a produção/liberação dessas citocinas e impediu o aumento na atividade da mieloperoxidase, com inibições de 75% para o TNF-  $\alpha$  (**Figura 20A**), 60% de IL-1 $\beta$  (**Figura 20B**), 64% de IL-6 (**Figura 20C**), 33% para KC (**Figura 20D**) e 65% para a atividade da mieloperoxidase (**Figura 20E**).





**Figura 20:** Efeito da  $\alpha,\beta$ -amirina na produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias e atividade da mieloperoxidase induzidas pela LPNC. O tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina (30 mg/kg;v.o.) foi realizado 1 h antes da LPNC. Os níveis de TNF- $\alpha$  (**A**; 4 h após a LPNC), IL-1 $\beta$  (**B**; 7 dias após LPNC), IL-6 (**C**; 3 dias após LPNC) e KC (**D**; 6 h após LPNC) foram acessados na região lombar da medula espinhal de camundongos após LPNC. A atividade da mieloperoxidase foi acessada na porção lombar da medula espinhal, 4 dias após LPNC (**E**). Cada coluna representa a média de 4-5 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa: #  $p < 0,05$  do grupo falso operado e \*  $p < 0,05$  do grupo tratado com veículo (Veic) submetido à LPNC.

## 5. Discussão

Os produtos naturais, incluindo as plantas superiores, microrganismos (fungos e bactérias) toxinas animais, entre outros, vêm sendo empregadas desde os tempos mais remotos para o desenvolvimento de medicamentos. São inúmeros os exemplos de medicamentos desenvolvidos totalmente, ou parcialmente a partir de produtos naturais, os quais foram registrados pelas agências regulatórias em todo o mundo para o tratamento das mais diversas doenças. Até o início da década de 50, grande parte dos medicamentos existentes eram praticamente derivados de produtos naturais. Com a descoberta da química sintética, esse quadro foi lentamente modificado, mas mesmo atualmente os produtos naturais ainda desempenham papel relevante no arsenal terapêutico (Zoreba, 2009). Outra contribuição importante dos produtos naturais, notadamente as toxinas, ocorreu nos avanços iniciados a partir da década de 70, do século XX, onde graças aos produtos naturais, foi possível entender, as vias de sinalização complexas que regulam a comunicação celular. Graças a esses novos conhecimentos gerados, foi possível desenvolver novos medicamentos mais seletivos para atuarem como ligantes de receptores acoplados a proteína G, inibidores de enzimas, bloqueadores de canais iônicos e mesmo aqueles que interferem com a sinalização celular e com receptores intracelulares (Carlsson et al., 2010). Certamente, a terapêutica moderna não seria a mesma, caso não pudéssemos utilizar os recursos naturais.

O presente estudo procurou investigar as propriedades anti-hiperalgésicas e antiinflamatórias, de uma das classes mais relevantes de princípios ativos existentes em várias plantas, os chamados triterpenos pentacíclicos. Além disso, o trabalho procurou avançar no que diz respeito aos mecanismos envolvidos nas ações anti-hiperalgésicas e antiinflamatórias do triterpeno pentacíclico  $\alpha,\beta$ -amirina, composto que, embora já tenha sido bem estudado do ponto de vista da farmacologia pré-clínica, seus mecanismos de ação ainda permanecem por serem esclarecidos.

Tal estudo se justifica, considerando que as opções terapêuticas disponíveis atualmente para o alívio da dor crônica têm sido apenas parcialmente efetivas na maioria dos pacientes, associado ao fato de que uso desses medicamentos é comumente associado a severos efeitos adversos (Mendell and Sahenk, 2003). Assim, a descoberta de novas substâncias com atividade analgésica e/ou antiinflamatória é ainda um

aspecto altamente desejável e de enorme importância para a utilização clínica.

Como já comentado, os compostos triterpenos pentacíclicos são encontrados em diferentes espécies vegetais, dentre elas as espécies do gênero *Protium*. Inúmeros trabalhos atribuem a esses compostos, incluindo a betulina, ácido ursólico, ácido oleanólico, e para a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina várias atividades biológicas (Otuki et al., 2005; Gao et al., 2007; Medeiros et al., 2007; Freitas et al., 2009; Cho et al., 2010). Devido à similaridade estrutural entre os triterpenos pentacíclicos com compostos esteroidais, destaca-se uma atividade biológica comum entre eles, a ação antiinflamatória (Aguirre et al., 2006; Medeiros et al., 2007; Vitor et al., 2009; Saaby et al., 2010; Cho et al., 2010; Liu et al., 2010). O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que o tratamento oral agudo ou repetido (durante 5 dias) com os compostos triterpenos pentacíclicos, betulina, ácido ursólico e ácido oleanólico resultou em um efeito anti-hiperalgésico significativo e prolongado, quando avaliados frente à hiperalgesia mecânica, em modelos de dor persistente de origem inflamatória induzida pela injeção i.pl. de CFA e ou de origem neuropática induzida pela LPNC em camundongos. Apesar dos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido ursólico e ácido oleanólico apresentarem um esqueleto de carbonos pentacíclico comum, uma pequena diferença estrutural pode estar influenciando nas diferenças observadas para a latência encontrada no efeito anti-hiperalgésico desses compostos. Essa diferença estrutural consiste na localização do grupo metila que, no ácido oleanólico está localizado no carbono-20 e no ácido ursólico no carbono-19 (Saaby et al., 2010). Essa mudança, apesar de aparentemente ser pequena, pode ser suficiente para ocasionar uma alteração na atividade biológica demonstrada por estes compostos, se levado em conta a forma espacial da molécula, onde e como, a molécula irá ligar-se aos seus alvos.

Atualmente está bem estabelecido, que tanto o processo de desenvolvimento, quanto a manutenção da dor persistente de origem inflamatória ou neuropática, está relacionados com a ativação de diversos tipos celulares e, consequentemente, com a liberação de mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos tais como: serotonina, histamina, e ativação de fatores de transcrição que resulta na produção/liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , dentre outras. Diante disso, a ação anti-hiperalgésica demonstrada por estes triterpenos pentacíclicos pode ser explicada, em parte, como sendo decorrente das suas atividades antiinflamatórias, ao inibir a ativação do fator de

transcrição NF- $\kappa$ B em cultura de macrófagos da linhagem murina (Wu et al., 2004, Huang et al., 2009) e por prevenir a fosforilação de I $\kappa$ B, em cultura de células leucêmicas (Shisho et al., 2003).

A farmacologia dos receptores canabinóides teve início na década de 60, quando foi isolado o primeiro canabinóide, o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) da planta *Cannabis sativa* (Mechoulam et al., 1967). A descoberta do  $\Delta^9$ -THC contribuiu para a descoberta do primeiro receptor canabinóide, denominado CB<sub>1</sub>, em 1988 por Devane e colaboradores, que foi clonado posteriormente por Matsuda et al. (1990). Um segundo receptor canabinóide, o CB<sub>2</sub>, com 44% de homologia com o CB<sub>1</sub>, foi identificado e clonado em 1993 (Munro et al., 1993). Apesar da semelhança existente entre os receptores, eles podem ser diferenciados de acordo com sua sequência de aminoácidos, seus mecanismos de sinalização e distribuição no organismo. Tanto o receptor CB<sub>1</sub> quanto o CB<sub>2</sub> são acoplados à proteína Gi/o e sua ativação resulta na inibição da adenilato ciclase e na estimulação das vias das MAP quinases. Ademais, possuem localizações distintas no sistema nervoso central resultando em ações distintas. O receptor CB<sub>1</sub> é encontrado em grande quantidade em áreas relacionadas ao controle do movimento, aprendizado e memória, percepção sensorial, recompensa, funções hormonais e temperatura corporal (Howlett et al., 2004). Além disso, os receptores canabinóides estão expressos em áreas responsáveis pelo processamento da dor, tais como tálamo, amígdala, substância periaquedutal (PAG), medula espinhal e neurônios periféricos (Farquhar-Smith et al., 2000). Na medula espinhal, o receptor CB<sub>1</sub> é encontrado em grande quantidade no corno dorsal, estando presente predominantemente nos axônios dos interneurônios nas lâminas I, II, III e X, sugerindo uma ação pré-sináptica consistente com a modulação da liberação de neurotransmissores quando ativado pelos seus agonistas. A expressão do receptor CB<sub>1</sub> na medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal possui funções modulatórias nos terminais periféricos nociceptivos, através da inibição da liberação de neurotransmissores (glutamato, noradrenalina, dopamina e acetilcolina) e também por inibir a despolarização dos neurônios (Hohmann e Herkenham, 1999a; 1999b).

Por muito tempo, o receptor CB<sub>2</sub> foi considerado um receptor periférico por estar presente em grande densidade em células envolvidas com a resposta imune e inflamatória. Este receptor foi inicialmente descoberto em macrófagos presentes no baço e, em seguida, encontrado em grande densidade em amígdalas de humanos (Galiègue et al., 1995). Atualmente, sabe-se que o receptor CB<sub>2</sub> está presente em vários tipos celulares, tais como linfócitos T e B, monócitos, macrófagos, mastócitos

e microglia (Galiègue et al., 1995; Cabral et al., 2008). A ativação do receptor CB<sub>2</sub> nas células do sistema imune interfere na liberação de mediadores inflamatórios e interfere na migração e recrutamento dessas células para o sítio onde tenha ocorrido uma lesão (Luongo et al., 2010; Murikinati et al., 2010). Estudos recentes demonstraram a presença do receptor CB<sub>2</sub> em diversas áreas do SNC, tais como tronco cerebral, córtex, hipotálamo, hipocampo, medula espinhal e gânglio da raiz dorsal (Wotherspoon et al., 2005; Onaivi et al., 2006). No entanto, a densidade do receptor CB<sub>2</sub> nestas áreas é menor quando comparada ao receptor CB<sub>1</sub>. Em situações patológicas têm sido detectado um aumento na expressão do receptor CB<sub>2</sub> em células que já o expressam naturalmente ou em células que são recrutadas para o local da lesão. A microglia está entre as células que são recrutadas e que expressa grande quantidade de receptores CB<sub>2</sub> (Fernández-Ruiz et al., 2007). Sendo ela uma célula de defesa do SNC, muito semelhante a um macrófago, em situações de estresse é recrutada para o local da possível lesão onde libera diferentes fatores, tais como óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (Fernández-Ruiz et al., 2007), que contribuem para a excitabilidade sináptica. Evidências sugerem que o aumento na expressão do receptor CB<sub>2</sub> também contribui para o controle da inflamação, por diminuir a quantidade de mediadores inflamatórios liberados com o intuito de manter a homeostase celular e por reduzir os danos associados aos processos de excitotoxicidade (Wotherspoon et al., 2005; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006; Jhaveri et al., 2008).

Já está bem estabelecido atualmente que o sistema canabinóide está envolvido na regulação dos processos nociceptivos e, devido a isto, grande interesse tem sido dado às pesquisas para a utilização dos canabinóides para o tratamento de diferentes tipos de dor. Muitos estudos pré-clínicos demonstraram que a ação dos canabinóides é muito parecida com o efeito antinociceptivo dos opióides e, devido a isto, sugerem a utilização dos agonistas canabinóides juntamente com outras substâncias analgésicas para possibilitar a administração de doses menores e evitar o aparecimento de efeitos colaterais (Fox et al., 2001).

Neste contexto, os resultados do presente estudo, demonstram a relevância do sistema canabinóide no controle da dor inflamatória, uma vez que o tratamento dos animais com os agonistas canabinóides ACEA (receptor CB<sub>1</sub>) e JWH-133 (receptor CB<sub>2</sub>), inibiu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA. De maneira interessante, o tratamento oral com a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina apresentou um efeito anti-hiperalgésico bastante similar quando

comparado ao tratamento i.p. realizado com os agonistas dos receptores CB<sub>1</sub> (ACEA) e CB<sub>2</sub> (JWH-133). Além disso, o pré-tratamento com os antagonistas seletivos dos receptores CB<sub>1</sub> (AM251) ou CB<sub>2</sub> (AM630) foi efetivo em prevenir tanto a hiperalgesia como a produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela injeção i.pl. de CFA, demonstrando dessa maneira que o efeito antinocicetivo da  $\alpha,\beta$ -amirina contra a dor e a inflamação para estar estreitamente relacionado com o sistema canabinóide. Além disso, estes resultados estão de acordo com aqueles descritos na literatura, que demonstraram que a ativação dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> é capaz de reduzir a hiperalgesia observada em diferentes modelos de dor persistente (Fox et al., 2001; Pertwee et al., 2001; Lim et al., 2003; Quartilho et al., 2003; Meng et al., 2008).

É importante ressaltar que a lesão causada pela injeção i.pl. de CFA ou pelo procedimento de LPNC acarreta em profundas alterações nas lâminas superficiais (I e II) e profundas (V e VI) de neurônios do corno dorsal, os quais são sensíveis a estímulos nocivos (Woolf & Mannion, 1999; Costigan, 2009; Woolf, 2010a). Entretanto, estudos que compararam estes dois modelos de dor persistente revelaram que eles induzem diferentes alterações na medula espinhal. Um exemplo desta diferença é a super expressão de receptores CB<sub>2</sub> na medula espinhal de camundongos submetidos à LPNC, evento este que não ocorre em animais com injeção i.pl. de CFA (Zhang et al., 2003).

O presente estudo demonstrou que tanto o tratamento com o antagonista do receptor CB<sub>1</sub>, quanto do receptor CB<sub>2</sub>, apresentou semelhante inibição do efeito anti-hiperalgésico apresentado pela mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina quando avaliado no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA ou pelo procedimento de LPNC.

Um das dificuldades em trabalhar com antagonistas de receptores canabinóides é a seletividade limitada dos antagonistas para cada receptor existentes. Levando em consideração a possível falta de seletividade dos antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, foi realizada uma nova série de experimentos onde os animais foram tratados por via intratecal com oligonucleotídeo antisense para cada um dos receptores, a fim de diminuir a expressão dos mesmos. Os resultados demonstraram que o tratamento com ODN-AS, tanto para os receptores CB<sub>1</sub>, quanto para os receptores CB<sub>2</sub>, foi eficaz em prevenir o efeito anti-hiperalgésico da  $\alpha,\beta$ -amirina, resultados que foram bastante semelhantes aos obtidos com o tratamento com o uso dos antagonistas desses receptores. Dessa forma, o emprego dos dois procedimentos farmacológicos parece não

deixar dúvida de que as ações anti-hiperalgésicas da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina dependem da interação com o sistema canabinóide.

No entanto, os efeitos da  $\alpha,\beta$ -amirina sobre o sistema canabinóide poderia decorrer de uma ação direta sobre os receptores ( $CB_1$  e  $CB_2$ ), ou na prevenção da degradação dos endocanabinóides ou a outro mecanismo indireto, o qual promoveria a ativação do sistema endocanabinóide. Para responder essa questão realizou-se um ensaio *in vitro* de ligação específica, para determinar se a  $\alpha,\beta$ -amirina poderia interagir diretamente com o receptor  $CB_1$ , com o receptor  $CB_2$ , ou com ambos. De maneira interessante, a  $\alpha,\beta$ -amirina inibiu de forma potente a ligação específica do radioligante do receptor  $CB_1$  e em menor intensidade a ligação específica do radioligante do receptor  $CB_2$ . O cálculo do  $K_i$  revelou que a  $\alpha,\beta$ -amirina possui afinidade 15.000 vezes maior para o receptor  $CB_1$  do que para o receptor  $CB_2$ . Este dado sugere que  $\alpha,\beta$ -amirina exerce suas ações anti-hiperalgésicas principalmente por ligar-se aos receptores  $CB_1$ , embora em situações patológicas, onde há um aumento na expressão de receptores  $CB_2$ , é provável que a  $\alpha,\beta$ -amirina reduza a inflamação e hiperalgesia por atuar também sobre estes receptores. Como não foi avaliado a ação da  $\alpha,\beta$ -amirina sobre as enzimas responsáveis pela degradação do endocanabinóides, não pode ser totalmente descartada uma ação desse composto nestas enzimas.

Como já comentado, os receptores  $CB_1$  estão predominantemente expressos em neurônios (Tsou et al., 1998; Maresz et al., 2007; Ahluwalia et al., 2000) e respondem diretamente pelas mudanças neuronais. A ativação dos receptores  $CB_1$  por agonistas seletivos reduz ambas a dor neuropática e inflamatória (Matsuda et al., 1990; Bridge et al., 2001; Fox et al., 2001). Entretanto, devido à grande expressão do receptor  $CB_1$  em áreas específicas do cérebro, há o aparecimento de efeitos sobre o SNC após o uso de alguns derivados canabinóides, especialmente o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), tais como redução do movimento, hipotermia, estimulação do apetite e catalepsia (Iversen, 2003), o que limita o uso terapêutico dos agonistas deste receptor. Nossos resultados demonstram que o tratamento oral com  $\alpha,\beta$ -amirina, na dose que causa efeitos anti-hiperalgésicos não causou nenhum distúrbio psicoativo, não alterando o desempenho locomotor, a temperatura corporal, a sensibilidade ou alterações no teste de catalepsia, sugerindo que a  $\alpha,\beta$ -amirina exerce suas ações principalmente por atuar em alvos de sítios periféricos.

Além disso, estudos revelam que os receptores CB<sub>1</sub> localizados no sistema nervoso periférico também são cruciais no controle da dor, independentemente da sua ativação no SNC (Agarwal et al., 2007; Amaya et al., 2006). De fato, há estudos que relatam a expressão do receptor CB<sub>1</sub> em neurônios aferentes primários (Sanudo-Pena et al., 1999; Ahluwalia et al., 2000, 2002; Bridges et al., 2003) e ainda demonstram sua fundamental importância na mediação de mecanismos inibitórios em neurônios periféricos para a produção da analgesia mediada pelos canabinóides (Agarwal et al., 2007). Enfatizando essa importância, Yesilyurt e colaboradores relataram que a administração periférica de agonistas seletivos do receptor CB<sub>1</sub>, aumenta o efeito antinociceptivo tópico demonstrado pela morfina (Yesilyurt et al., 2003). De encontro com esses dados, o tratamento local (pata) com a  $\alpha,\beta$ -amirina (30  $\mu$ g/pata) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção i.pl. de CFA, sugerindo que a ativação dos receptores CB<sub>1</sub> periféricos pela  $\alpha,\beta$ -amirina pode ser importante para explicar seu efeito antinociceptivo. É importante destacar também que camundongos tratados cronicamente com  $\alpha,\beta$ -amirina não foram susceptíveis à tolerância, reforçando a ausência de efeitos sobre o sistema nervoso central.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a administração da  $\alpha,\beta$ -amirina diretamente no SNC, pela injeção intratecal ou intracerebroventricular, produziu inibição significativa em ambas as fases, neurogênica e inflamatória da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina, bem como a nocicepção neurogênica induzida pela injeção i.pl. de capsaicina (Otuki et al., 2005). Neste mesmo estudo, os autores também demonstraram que o tratamento sistêmico com  $\alpha,\beta$ -amirina não causou alterações na atividade locomotora dos animais.

Além disso, o tratamento oral com a  $\alpha,\beta$ -amirina não causou modulação da expressão do mRNA para os receptores canabinóides no córtex cerebral de camundongos. Esta conclusão baseia-se no fato de que o mesmo tratamento alterou os níveis de mRNA para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> na medula espinhal, sugerindo que, embora o composto module a expressão dos receptores canabinóides no sistema nervoso central, mais especificamente na medula espinhal, este efeito não é estendido ao cérebro. As alterações causadas pelo tratamento com  $\alpha,\beta$ -amirina sobre a expressão do mRNA dos receptores canabinóides na medula espinhal pode ser devido a um efeito indireto do composto em reduzir a ativação neuronal periférica. Estes resultados em conjunto, sugerem que a  $\alpha,\beta$ -amirina atua interagindo com o sistema canabinoide



preferencialmente sobre alvos periféricos. Entretanto, experimentos de farmacocinética são ainda necessários para melhor entender a distribuição da  $\alpha,\beta$ -amirina após sua administração sistêmica e a sua habilidade em atravessar a barreira hematoencefálica.

Os resultados do presente estudo também sugerem que as ações antinociceptivas da  $\alpha,\beta$ -amirina podem estar intimamente relacionadas com suas propriedades antiinflamatórias. De fato, embora a  $\alpha,\beta$ -amirina apresente uma menor afinidade pelo receptor  $CB_2$  do que pelo receptor  $CB_1$ , os resultados encontrados sugerem que durante processos inflamatórios crônicos, onde há aumento na expressão do receptor  $CB_2$ , a  $\alpha,\beta$ -amirina parece exercer seus efeitos por ligar-se também a este receptor ( $CB_2$ ). A ativação direta dos receptores  $CB_2$  é conhecida por reduzir a liberação de citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição e assim, reduzir a progressão da inflamação (Gertsch, 2008). Os resultados do presente estudo mostram que, o tratamento oral com a  $\alpha,\beta$ -amirina diminuiu de maneira significativa a produção/liberação de citocinas/quimiocinas como  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $KC$ , bem como a atividade da enzima mieloperoxidase (indicador indireto da migração de neutrófilos para o sítio da inflamação), quando avaliados nos dois modelos de dor persistente investigados. É importante ressaltar que este efeito parece estar relacionado com a ativação do sistema canabinóide, uma vez que, o tratamento prévio com os antagonistas canabinóides bloqueou de maneira marcante o efeito antiinflamatório da  $\alpha,\beta$ -amirina.

Diante disto, pode-se afirmar que os efeitos observados no presente estudo para a  $\alpha,\beta$ -amirina podem não depender exclusivamente da ativação dos receptores canabinóides. Estudos anteriores corroboram esta idéia, quando demonstraram que a  $\alpha,\beta$ -amirina foi efetiva em inibir a  $PKC$ ,  $PKA$ ,  $MAPK$ , bem como a expressão da  $COX-2$  e a ativação de fatores de transcrição como o  $NF-kB$  e  $CREB$  (Medeiros et al., 2007; Otuki et al., 2005a). Além disso, a  $\alpha,\beta$ -amirina também foi efetiva em inibir a nocicepção induzida por capsaicina, glutamato e bradicinina, sem alterar contudo, a ligação específica destes compostos com os seus receptores (Otuki et al., 2005). Corroborando esses dados citados acima, o presente trabalho demonstra que a ação anti-hiperalgésica da  $\alpha,\beta$ -amirina também está associada à redução da ativação dos fatores de transcrição incluindo o  $NF-kB$  e  $CREB$  e, consequentemente, com redução da expressão da enzima  $COX-2$  tanto em tecido periférico (células da derme da pata) quanto na medula espinhal de camundongos. Pode-se ainda atribuir à inibição dos fatores de transcrição  $NF-kB$  e

CREB a redução na produção de citocinas evidenciada no tratamento com a  $\alpha,\beta$ -amirina.

Está atualmente bem demonstrado que a fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, e sua translocação do citoplasma para o núcleo promove a transcrição gênica da enzima COX-2 e de diversas citocinas pró-inflamatórias (Kim et al., 1998; Ghosh & Karin, 2002). Ademais, a ativação do fator de transcrição CREB também pode resultar na transcrição da COX-2 (Schroer et al., 2002), além de fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios (Pham et al., 2008; Zhao et al., 2007). Diante disto, os resultados do presente estudo sugerem que a inibição da ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e CREB contribuem de maneira importante para o efeito anti-hiperalgésico duradouro apresentado pela  $\alpha,\beta$ -amirina, tanto quando avaliado no modelo de dor inflamatória, quanto no modelo de dor neuropática, uma vez que a maioria dos mediadores inflamatórios modulados por estes fatores transcricionais são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção desses dois tipos de dor persistente.

Há diversas evidências na literatura indicando que o sistema endocanabinóide inibe os níveis da citocina TNF- $\alpha$  via interação com o receptor CB<sub>2</sub> (Rajesh et al., 2008; Mechoulam and Shahami, 2007). Sabe-se que a citocina TNF- $\alpha$  deflagra a ativação das vias de sinalização das vias mediadas pelas MAPK ERK, p38, JNK e Akt (proteína quinase serina/treonina) e que a inibição dessa citocina pelo tratamento com agonistas seletivos dos receptores CB<sub>2</sub>, como o JWH-133 e o HU-308, podem modular diversos processos inflamatórios desencadeados por esta citocina (Bátkai et al., 2007; Rajesh et al., 2007). De acordo com estas evidências, a alta eficiência demonstrada pela  $\alpha,\beta$ -amirina em interferir com a progressão do estado inflamatório da lesão em modelos de dor persistente pode ser devido à sua habilidade em aumentar a atividade funcional do sistema canabinóide.

Em resumo, os resultados aqui apresentados demonstram, pela primeira vez, a pronunciada atividade anti-hiperalgésica e antiinflamatória dos triterpenos pentacíclicos betulina, ácido ursólico e ácido oleanólico, bem como para a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina, em modelos de dor persistente do tipo inflamatória e neuropática. Além disso, corroboram para explicar os mecanismos acerca das ações anti-hiperalgésicas e antiinflamatórias da mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina, a estreita relação deste composto com o sistema canabinóide, além da inibição de vias transducionais e da inibição de citocinas. Fatores de grande relevância nos processos dolorosos e inflamatórios.

Como demonstrado anteriormente, a mistura de isômeros  $\alpha,\beta$ -amirina é bastante segura para animais, quando avaliada sua potencial toxicidade (Vitor et al., 2009). Levando em consideração que a disponibilidade de medicamentos eficazes e seguros ao tratamento da dor persistente, especialmente dor neuropática e inflamatória, ainda é escassa, o presente trabalho apresenta-se de grande relevância clínica e pode contribuir para a investigação da mistura racêmica  $\alpha,\beta$ -amirina em testes clínicos para o alívio da dor.

## 6. Conclusão

Analizados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os compostos triterpenos pentacíclicos, especialmente a  $\alpha,\beta$ -amirina, possuem marcada atividade antinociceptiva quando administrados por via sistêmica e avaliados em modelos de dor persistente de origem inflamatória e neuropática. As ações da  $\alpha,\beta$ -amirina decorrem da sua capacidade de interagir preferencialmente com os receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e, em menor grau, com os receptores CB<sub>2</sub>. Além disso, a marcada ação antiinflamatória relatada para a  $\alpha,\beta$ -amirina, por inibir a fatores de transcrição nucleares como o NF- $\kappa$ B e CREB, com consequente inibição da COX-2 e citocinas pro-inflamatórias, certamente contribuem para explicar suas ações antinociceptivas. Assim, pode se classificar a  $\alpha,\beta$ -amirina como sendo um fitocabinoide com grande afinidade para os receptores CB<sub>1</sub>, mas destituído de efeito estimulante sobre o SNC.

## 7. Referências Bibliográficas

- Abrahamsen B, Zhao J, Asante CO, Cendan CM, Marsh S, Martinez-Barbera JP, Nassar MA, Dickenson AH, Wood JN. The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science*. 2008; 1;321(5889):702-5.
- Abu-Saad Huijjer H. Chronic Pain : A review. *J Med Liban*, 2010; 58 (1): 21-27.
- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*. 2000; 100(4):685-8.
- Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Capogna M, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurons. *Neuroscience*. 2002; 110(4): 747-53.
- Altier C, Dale CS, Kisilevsky AE, Chapman K, Castiglioni AJ, Matthews EA, Evans RM, Dickenson AH, Lipscombe D, Vergnolle N, Zamponi GW. Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *J Neurosci*. 2007; 13;27(24): 6363-73.
- Amaya F, Shimosato G, Kawassaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M. Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. 2006; *Pain* 124(1-2): 175-83.
- Aragão GF, Pinheiro MC, Nogueira Bandeira P, Gomes Lemos TL, de Barros Viana GS. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.). *J Herb Pharmacother.*, 2007; 7(2): 31-47.
- Barkin RL, Barkin SJ, Barkin DS. Pharmacotherapeutic management of pain with a focus directed at the geriatric patient. *Rheum Dis Clin North Am*. 2007; 33(1): 1-31.
- Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 2009; 30;373(9678): 1905-17.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009; 139(2): 267-84.

- Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Pan H, El-Assal O, Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hong F, Harvey-White J, Jafri A, Haskó G, Huffman JW, Gao B, Kunos G, Pacher P. Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J*. 2007; 21(8): 1788-800.
- Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC. The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha 2 delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha 2 delta ligand pregabalin. *J Neurosci*. 2009; 1; 29(13): 4076-88.
- Beltramo M N, Bernardini et al. CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *Eur J Neurosci.*, 2006; 23(6): 1530-8.
- Bennett AD, Everhart AW, Hulsebosch CE. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *Brain Res*. 2000; 17;859(1):72-82.
- Berrocoso E, Sánchez-Blázquez P, Garzón J, Mico JA. Opiates as antidepressants. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(14):1612-22.
- Bingham B, Ajit SK, et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. *Nat Clin Pract Rheumatol.*, 2009; 5(1): 28-37.
- Bortolanza LB, Ferreira J, Hess SC, Delle Monache, F, Yunes RA, Calixto JB. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur J Pharmacol*. 2002; 25:203-208.
- Bosier B, Lambert DM, Hermans E. Reciprocal influences of CB1 cannabinoid receptor agonists on ERK and JNK signalling in N1E-115 cells. *FEBS Lett*. 2008; 26;582(28):3861-7.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.
- BridgesD, Ahmad K, Rice AS. The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in rat model of neuropathic pain. 2001. *Br J Pharmacol*. 133(4):586-94.
- Cabral GA, Raborn ES et al. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.*, 2008; 153(2): 240-51.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Filho VC, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phyther Res*. 2000; 14(6):401-18.

- Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 2004; 143(7):803-18.
- Campos MM, Souza GE, Ricci ND, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB. The role of migrating leucocytes in IL-1 $\beta$ -induced up-regulation of kinin B1 receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2002; v. 135, p. 1107-1114.
- Carlsson J, Yoo L, Gao ZG, Irwin JJ, Shoichet BK, Jacobson KA. Structure-based discovery of A2A adenosine receptor ligands. *J Med chem.* 2010. 13; 53 (9): 3748-55.
- Cha SH, Lee WK, Kim KA, Lim Y, Han JS, Lee KH. Effect of silica on phospholipase D activity in rat alveolar macrophages. *Ind Health.* 1998; 36(3):258-62.
- Chattopadhyay D, Arunachalam G, Mandal AB, Sur TK, Mandal SC, Bhattacharya SK. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *J Ethnopharmacol.* 2002; 82(2-3):229-37.
- Chen Y, Sommer C. Activation of the nociceptin opioid system in rat sensory neurons produces antinociceptive effects in inflammatory pain: involvement of inflammatory mediators. *J Neurosci Res.*, 2007; 15;85(7):1478-1488.
- Cheng HY, Pitcher GM, Laviolette SR, Whishaw IQ, Tong KI, Kockeritz LK, Wada T, Joza NA, Crackower M, Goncalves J, Sarosi I, Woodgett JR, Oliveira-dos-Santos AJ, Ikura M, van der Kooy D, Salter MW, Penninger JM. DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell*, 2002; 11;108(1):31-43.
- Cho JH, Lee JY, Sim SS, Whang WK, Kim CJ. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010; 23(3):190-9.
- Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. 2004; *Nat Rev Immunol* 4(12):978-88.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32:1-32.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 359-371.
- D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 1941. 72:74-9.

- Dackis C, O'Brien. Neurobiology of addiction: treatment and public policy ramifications. *Nature Neuroscience* 2005; 8 (11): 1431-36.
- Dogrul A, Gardell LR, Ma S, Ossipov MH, Porreca F, Lai J. „Knock-down“ of spinal CB1 receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. *Pain* 2002; 100: 203-9.
- Dworkin RH, Backonja M et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol.*, 2003; 60(11): 1524-34.
- Dworkin RH, O'Connor AB et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc.*, 2010; 85(3 Suppl): S3-14.
- Eisenach JC, Gebhart GF. Intrathecal amitriptyline. Antinociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine, and carbamylcholine in rats. *Anesthesiology*. 1995; 83(5):1036-45.
- Elikkottil J, Gupta P, Gupta K. The analgesic potential of cannabinoids. *J Opioid Manag.* 2009; 5(6):341-57.
- Elmes SJ, Jhaveri MD, Smart D, Kendall DA, Chapman V. Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in naïve rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain *Eur J Neurosci*. 2004; 20(9):2311-20.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ.* 1985; 63(6):965-81.
- Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 2000; 15(6):510-21.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, MacKie K, Blond O, Lai Y, Ma AI, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995; 48(3): 443-50.
- Fernandez-Ruiz J, Romero J. et al. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.*, 2007; 28(1): 39-45.
- Ferreira SH, Zanin T, Lorenzetti BB, de Souza MZ, Medeiros MC, Leme JG. Increased vascular permeability, oedema and hyperalgesia caused by carrageenin in the rat's paw proceedings. *Agents Actions*. 1978; 8(1-2):159.
- Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L and James I. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the



antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 2001; 92:91-100.

Freitas CS, Baggio CH, Dos Santos AC, Mayer B, Twardowschy A, Luiz AP, Marcon R, Soldi C, Pizzolatti MG, Dos Santos EP, Marques MC, Santos AR. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009; 104(4):285-92.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995; 15;232(1):54-61.

Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu Y, Dulchavsky SA, Gautam SC. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling *J Neurooncol.* 2007; 84(2):147-57.

Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther.* 2010; 126(1):56-68.

Gertsch J, Pertwee RG, and Di Marzo V. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? *Br J Pharmacol* 2010; 160:523-9.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. 2002. *Cell.* 109 suppl:S81-96.

Giblin GM, O'Shaughnessy CT, Naylor A, Mitchell WL, Eatherton AJ, Slingsby BP, Rawlings DA, Goldsmith P, Brown AJ, Haslam CP, Johnson MR, Mitchell WL, Naylor A, Perboni A, Slingsby BP and Wilson AW. Discovery of 2-[(2,4-dichlorophenyl)amino]-N-[(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]-4-(trifluoromethyl)-5-pyrimidinecarboxamide, a selective CB2 receptor agonist for the treatment of inflammatory pain. *J Med Chem* 2009; 50:2597-2600.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 2006; 1071(1):10-23.

Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med.* 2010; 16(11):1248-57.

Graham JM, Evans B. Severe uncontrolled pain in buttock in a patient on naltrexone: a diagnostic challenge. *Anaesth Intensive Care.* 2005; 33(6):808-11.

Greineisen WE, Turner H. Immunoactive effects of cannabinoids: considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. 2010. *Int Immunopharmacol.* 10(5):547-55.

- Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009; 8 (6): 403-21.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32: 77- 88.
- Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, Cordeiro RS. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res.* 1987; 20(2):243-9.
- Herzberg U, Eliav E, Bennett GJ, Kopin IJ. The analgesic effects of R(+)-WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 1997; 17;221(2-3):157-60.
- Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature.* 2005; 23;435(7045):1108-12.
- Hohmann AG, Herkenham M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience.* 1999a; 92(4):1171-5.
- Hohmann AG, Herkenham M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. *Neuroscience.* 1999b; 90(3):923-31.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology.* 2004;47 Suppl 1:345-58.
- Hsu HY, Yang JJ, Lin CC. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett.* 1997; 1;111(1-2):7-13.
- Huang HC, Huang CY, Lin-Shiau SY, Lin JK. Ursolic acid inhibits IL-1beta or TNF-alpha-induced C6 glioma invasion through suppressing the association ZIP/p62 with PKC-zeta and downregulating the MMP-9 expression. *Mol Carcinog.* 2009; 48(6):517-31.
- Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Lou YR, Stauber K, Ma W, Georgiadis C, Laskin JD, Conney AH. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* 1994; 1;54(3):701-8.
- Huda ASH. Chronic pain: a Review. *J Med Liban,* 2010 ; 58 (1) : 21-27.
- Ibrahin MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A and Malan Jr. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *PNAS.* 2003; 100 (18):10529-33.

- Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain* 2003; 126(Pt6):1252-70.
- Jesse CR, Wilhelm EA, Barbosa NB, Nogueira CW. Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* 2009; 24;613(1-3):74-8.
- Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol.* 2007; 36(1):26-35.
- Ji RR, Strichartz G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Science* 2004; 252:1–19.
- Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain.* 2007; 1;3:33.
- Kato MJ. Global phytochemistry: the Brazilian approach. *Phytochemistry* 2001; 57(5):621-3.
- Kawamura Y, et al. The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci.* 2006; 26:2991-3001.
- Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. Activation of extracellular signal-regulated kinase in sciatic nerve contributes to neuropathic pain after partial sciatic nerve ligation in mice. *Anesth Analg.* 2009; 109(4):1305-11.
- Kim Y, Fischer SM. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem.* 1998; 273(42):27686-94.
- Koehn, F. E. and G. T. Carter. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(3):206-20.
- Kohno T, Ji RR, Ito N, Allchorne AJ, Befort K, Karchewski LA, Woolf CJ. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain.* 2005; 117(1-2):77-87.
- Larson, A.A., Brown, D.R., El-atrash, S., Walser, M.M. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: a possible model of chronic pain in the mouse. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986; 24: 49-53.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain.* 2009; 10(9):895-926.
- Laursen SE, e Belknap JK, Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. *J. Pharmacol. Methods.* v. 16, p. 355-357, 1986.

- Le Bars D, Gozariu M, Cadden S. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, 2001; 53: 597-652.
- Li Y, Kang Z, Li S, Kong T, Liu X, Sun C. Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54(11):1609-17.
- Lim G, Sung B et al. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55,212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain*, 2003; 105(1-2): 275-83.
- Lima-Júnior RC, Oliveira FA, Gurgel LA, Cavalcante IJ, Santos KA, Campos DA. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Med* 2006; 72(1):34-9.
- Lin CC, Huang CY, Mong MC, Chan CY, Yin MC. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J Agric Food Chem*. 2011; 26;59(2):755-62.
- Liu C, Wlaker M. Effects of a cannabinoid agonist on spinal nociceptive neurons in a rodent model of neuropathic pain. *J Neurophysiol*. 2006; 96:2984-94.
- Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 1995; 1;49(2):57-68.
- Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008; 31;137(3):473-7.
- Lozovaya N, Min R, Tsintsadze V, Burnashev N. Dual modulation of CNS voltage-gated calcium channels by cannabinoids: Focus on CB1 receptor-independent effects. *Cell Calcium*. 2009; 46(3):154-62.
- Luongo L, Palazzo E, Tambaro S, Giordano C, Gatta L, Scafuro MA, Rossi FS, Lazzari P, Pani L, de Novellis V, Malcangio M, Maione S. 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. *Neurobiol Dis*. 2010; 37(1):177-85
- Lynch ME. The pharmacotherapy of chronic pain. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008; 34(2):369-85.
- MacMahon S, Cafferty WBJ, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol*. 192: 444– 462, 2005.
- Maia JL, Lima-Júnior RC, David JP, David JM, Santos FA, Rao VS. Oleanolic Acid, a pentacyclic triterpene attenuates the mustard oil-induced colonic nociception in mice. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(1):82-5.
- Malmberg AB, Basbaum. AI Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 1998; 76(1-2):215-22.

- Máñez S, Recio MC, Giner RM, Ríos JL. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol.* 1997; 3;334(1):103-5.
- Manson JE. Pain: sex differences and implications for treatment. *Metabolism.* 2010; 59 Suppl 1:S16-20.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D and Dittel BN. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med* 2007; 13:492-497.
- Martin WJ, Loo CM, Basbaum AL. Spinal cannabinoids are anti allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain* 1999; 82(2):199-205.
- Matsuda LA, Lalait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346(6284):561-4.
- Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A. N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol.* 1996; 11;300(3):227-36.
- McCakill D, Croteau R. Popects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 55:107-146, 1997.
- Mechoulam R, Shohami E. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol Neurobiol.* 2007; 36(1):68-74.
- Medeiros R, Otuki MF, Avellar MC, Calixto JB. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Eur J Phamacol* 2007; 559: 227-35.
- Mendell, J.R. e Sahenk, Z.. Painful sensory neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 2003; v. 348, p. 1243-1255.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ and Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature* 1998; 395:381-3.
- Meybohm P, Brand PA, Ufer M, Thiemann F, Steinfath M, Paris A, Scholz J, Bein B. Additive interaction of the cannabinoid receptor I agonist arachidonyl-2-chloroethylamide with etomidate in a sedation model in mice. *Anesthesiology.* 2008; 108(4):669-74.
- Montanari CA, Bolzani VS. Planejamento racional de fármaco baseado em produtos naturais. *Química Nova* 2001, 24(1): 105-111.

Moore N, Le Parc JM, van Ganse E, Wall R, Schneid H, Cairns R. Tolerability of ibuprofen, aspirin and paracetamol for the treatment of cold and flu symptoms and sore throat pain. *Int J Clin Pract.* 2002; 56(10):732-4.

Morgan NH, Stanford IM et al. Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, 2009; 57(4): 356-68.

Murikinati S, Jüttler E, Keinert T, Ridder DA, Muhammad S, Waibler Z, Ledent C, Zimmer A, Kalinke U, Schwaninger M. Activation of cannabinoid 2 receptors protects against cerebral ischemia by inhibiting neutrophil recruitment. *FASEB J.* 2010; 24(3):788-98.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365 (6441): 61-5.

Mutai C, Abatis D, Vagias C, Moreau D, Roussakis C, Roussis V. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry.* 2004; 65(8):1159-64.

Netzeband JG, Conroy SM, Parsons KL, Gruol DL. Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca<sup>2+</sup> signals in cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci.* 1999; 15;19(20):8765-77.

Oliveira FA, Costa CL, Chaves MH, Almeida FR, Cavalcante IJ, Lima AF, Lima RC jr, Silva RM, Campos AR, Santos FA, Rao VS. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and betaamyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sci* 1998; 21;77(23):2942-52.

Onaivi ES, Ishiguro H et al. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.*, 2006; 1074: 514-36.

Otuki MF, Ferreira J, Lima FV, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos AR, Yunes RA and Calixto JB. Antinociceptive properties of a mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2005a; 313: 310-8.

Otuki MF, Vieira-Lima F, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB. Topical anti-inflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol* 2005b; 507:253-9.

- Ovesná Z, Kozics K, Bader Y, Saiko P, Handler N, Erker T, Szekeres T. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines. *Oncol Rep.* 2006; 16(3):617-24.
- Peat S. Using cannabinoids in pain and palliative care. *Int J Palliat Nurs.* 2010; 16(10):481-5.
- Pertwee RG. The ring test: a quantitative method for assessing the 'cataleptic' effect of cannabis in mice. *Br J Pharmacol*, 1972; v.46, n.4, (753-63).
- Pham H, Chong B, Vicenti R, Slice LW. Ang II and EGF synergistically induce COX-2 expression via CREB in intestinal epithelial cells. 2008. *J Cell Physiol.* 214(1):96-109.
- Phillipson JD, Anderson LA. Ethnopharmacology and Western medicine. *J Ethnopharmacol.* 1989; 25(1): 61-72.
- Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP Jr. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology.* 2003; 99(4):955-60.
- Raduner S, et al. Alkylamides from Echinacea are a new class of cannabinomimetics. Cannabinoid type 2 receptor dependent and - independent immunomodulatory effects. *J Biol Chem.*, 2006; 281:14192-14206.
- Rahn EJ, Makriyannis A, Hohmann AG. Activation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors suppresses neuropathic nociception evoked by the chemotherapeutic agent vincristine in rats *Br J Pharmacol.* 2007; 152(5):765-77.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(2):347-57.
- Rates SMK. Plants as sources of drugs. *Toxicon* 2001; 39:603-13.

Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med.* 1995; 61(2):182-5.

Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J Neurosci.* 1998; 1;18(1):451-7.

Rittner HL, Brack A, Stein C. Pain and the immune system. *Br J Anaesth.* 2008; 101(1):40-4.

Rivers JR, Ashton JC. The development of cannabinoid CBII receptor agonists for the treatment of central neuropathies. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2010; 10(1):47-64.

Rog DJ, Nurmikko TJ, Young CA. Oromucosal delta9-tetrahydrocannabinol/cannabidiol for neuropathic pain associated with multiple sclerosis: an uncontrolled, open-label, 2-year extension trial. *Clin Ther.* 2007; 29(9):2068-79.

Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, Dubuquoy C, Merour E, Geboes K, Chamaillard M, Ouwehand A, Leyer G, Carcano D, Colombel J-F, Ardid D and Desreumaux P. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nature Medicine* 2007; 13(1): 35-7.

Saaby L, Jäger AK, Moesby L, Hansen EW, Christensen SB. Isolation of immunomodulatory triterpene acids from a standardized rose hip powder (*Rosa canina* L.). *Phytother Res.* 2011; 25(2):195-201. doi: 10.1002/ptr.3241.

Sagar DR, Kelly S, Millns PJ, O'Shaughnessy CT, Kendall DA, Chapman V. Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci.* 2005; 22(2):371-9.

Sañudo-Peña MC, Romero J, Seale GE, Fernandez-Ruiz JJ, Walker JM. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol.* 2000; 391(3):269-74.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. 1997. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142(2):278-87.

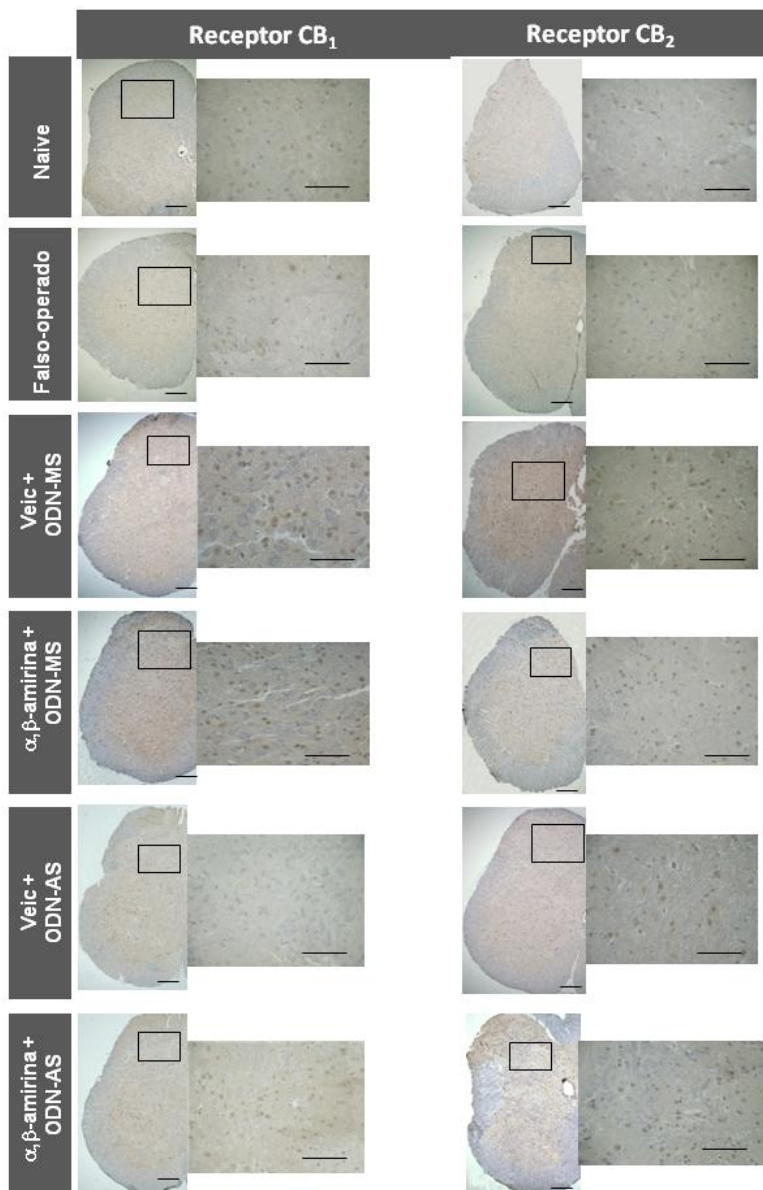
Schroer K, Zhu Y, Saunders MA, Deng WG, Xu XM, Meyer-Kirchraht J, Wu KK. Obligatory role of cyclic adenosine monophosphate response element in cyclooxygenase-2 promoter induction and feedback regulation by inflammatory mediators. *Circulation* 2002; 105(23):2760-5.



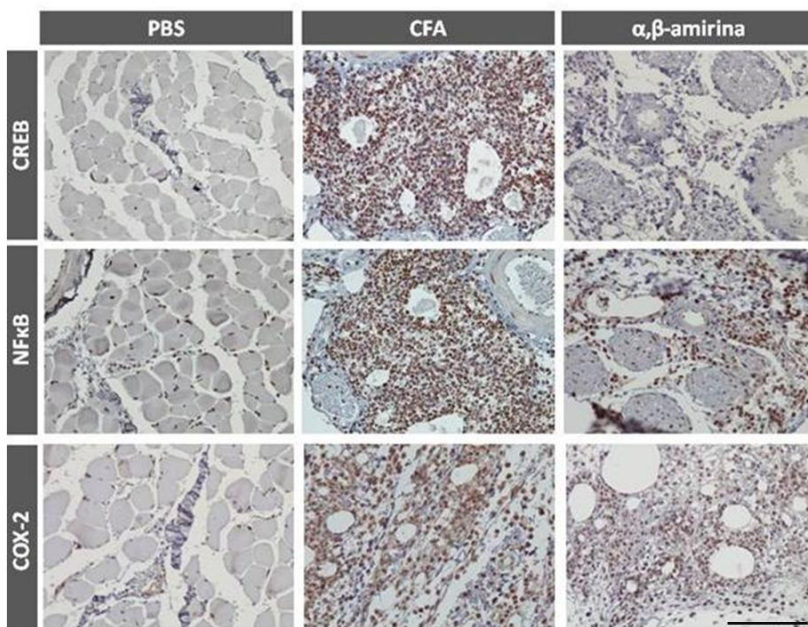
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990; 43:205-18.
- Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, Aggarwal BB. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.* 2003; 1;63(15):4375-83.
- Siegling A, Hofmann HA et al. Cannabinoid CB(1) receptor upregulation in a rat model of chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.*, 2001; 415(1): R5-7.
- Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre-RS, 2003; Editora da UFSC e UFRGS. 3a. ed.
- Singh GB, Singh S, Bani S, Gupta BD, Banerjee SK. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J Pharm Pharmacol.* 1992; 44(5):456-8.
- Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol.* 1994; 72(1):169-79.
- Smith TE, Chong MS. Neuropathic Pain. *Hosp Med.*, 2000; 61(11):760-6.
- Takada Y, Aggarwal BB. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *J Immunol.* 2003; 15;171(6):3278-86.
- Tramèr MR, Carroll D, Campbell FA, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. *BMJ.* 2001; 7;323(7303):16-21.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K and Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83:393-411.
- Tzellos TG, Papazisis G, Amaniti E, Kouvelas D. Efficacy of pregabalin and gabapentin for neuropathic pain in spinal-cord injury: an evidence-based evaluation of the literature. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64(9):851-8.
- Valenzano KJ, Tafesse L, Lee G, Harrison JE, Boulet JM, Gottshall SL, Mark L, Pearson MS, Miller W, Shan S, Rabadi L, Rotshteyn Y, Chaffer SM, Turchin PI, Elsemore DA, Toth M, Koetzner

- L, Whiteside GT. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy. *Neuropharmacology*. 2005; 48(5):658-72.
- Van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Campi B, McNaughton P, Geppetti P, Di Marzo V. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying  $\text{Ca}^{2+}$  influx via TRPV1 channels. *EMBO J*. 2005; 7;24(17):3026-37.
- Van Sickle MD, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 2005; 310:329-332.
- Vaz ZR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. 1996. *J Pharmacol Exp Ther*. 278(1): 204-12.
- Vitor CE, Figueiredo CP, Hara DB, Bento AF, Mazzuco TL, Calixto JB. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol* 2009; 157(6):1034-44.
- Voscopoulos C, Lema M. When does acute pain become chronic? *Br J Anaesth*. 2010; 105 Suppl 1:i69-85.
- Whiteside GT, Gottshall SL, Boulet JM, Chaffer SM, Harrison JE, Pearson MS, Turchin PI, Mark L, Garrison AE, Valenzano KJ. A role for cannabinoid receptors, but not endogenous opioids, in the antinociceptive activity of the CB2-selective agonist, GW405833. *Eur J Pharmacol*. 2005; 28;528(1-3):65-72.
- Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 1999; 5;353(9168):1959-64.
- Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007; 2;55(3):353-64.
- Woolf CJ. Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat Med*. 2010; 16(11):1241-7.
- Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest*. 2010 Nov 1;120(11):3742-4.
- Woolf, C.J. e Mannion, R.J.. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. v. 353, p. 1959-1965, 1999.
- Woolf, C.J. e Salter, M.W.. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, 2000.
- Wootherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. 2005. *Neuroscience*. 135(1):235-45.

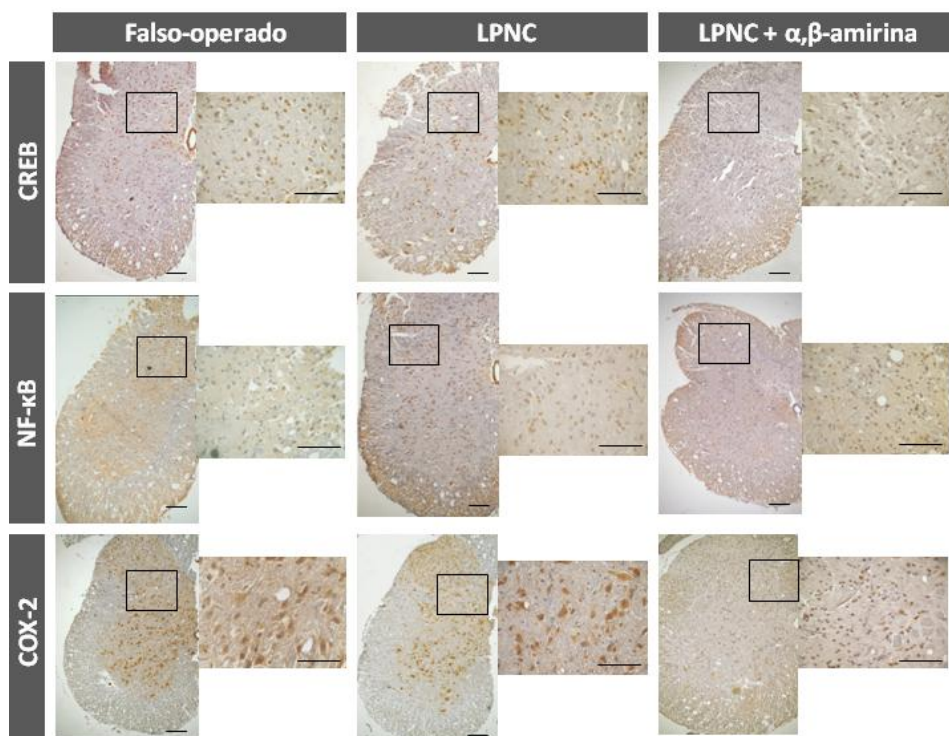
- Wu MJ, Wang L, Ding HY, Weng CY, Yen JH. *Glossogyne tenuifolia* acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF-kappa B. *J Biomed Sci.* 2004; 11(2):186-99.
- Yan L, Wang Q, Fu Q, Ye Q, Xiao H, Wan Q. Amitriptyline inhibits currents and decreases the mRNA expression of voltage-gated sodium channels in cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 2010; 8;1336:1-9.
- Yesilyurt O, Dogrul A, Gul H, Seyrek M, Kusmez O, Ozkan Y, Yildiz O. Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain.* 2003; 105(1-2):303-8.
- Yu XH, Cao CQ, Martino G, Puma C, Morinville A, St-Onge S, Lessard E, Perkins MN, Laird JM. A peripherally restricted cannabinoid receptor agonist produces robust anti-nociceptive effects in rodent models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2010; 151(2):337-44.
- Zareba G. Phytotherapy for pain relief. *Drugs Today* 2009. 45(6): 445-67.
- Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Grobleuski T, Ahmad S. and O'Donnel D. Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *European Journal of Neuroscience* 2003; 17: 2750-54.

**Anexos**

**Anexo I:** Imagens representativas da imunistoquímica realizadas em células do corno dorsal da medula espinhal para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, após o tratamento com ODN-AS (escala 50 µm).



**Anexo II:** Imagens representativas da imunoistoquímica realizada na derme da pata de camundongos para CREB, NF-kB e COX-2 (escala 50  $\mu$ m).



**Anexo III:** Imagens representativas da imunoistoquímica realizada em células do corno dorsal da medula espinal de camundongos para CREB, NF- $\kappa$ B e COX-2 (escala 50  $\mu$ m).

## **Publicações**

**Parte dos resultados da presente tese está submetida à publicação em:**

**Silva, Kathryn Ana** ; Passos GF ; Paszcuck AF ; Simão da Silva, E ; Meotti FC ; Calixto JB . The role of the cannabinoid system on the antinociceptive action of the pentacyclic triterpene alpha and beta amyrin. (Aceito para publicação ao periódico Pain).

### **Prêmios recebidos durante o doutorado**

IBRO-SfN Travel Grants 2009/ Chicago-IL.

## **OUTROS TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O DOUTORADO**

Passos, G. F.; Figueiredo, C. P.; Prediger, R.; **Silva, Kathryn Ana**; Siqueira, J. M.; Duarte, F. S.; Leal, P. C.; Medeiros, R.; Calixto, J. B. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. *Brain Behavior and Immunity*; v. 24, p. 493-501, 2010.

Dutra R; **Silva, Kathryn Ana**; Motta EM; Pazcuk AF; Calixto JB. Cannabinoid Receptors Mediate the Analgesic Effect of Euphol in Inflammatory and Neuropathic Persistent Pain in Rodents. (Manuscrito Submetido ao periódico *British Journal of Pharmacology*).

Paszcuck AF; Dutra R; **Silva, Kathryn Ana**; Quintao, N. L.; Campos, M. M.; Calixto, J. B. Cannabinoid receptor agonists inhibit neuropathic pain-like behavior induced by brachial plexus avulsion in mice. (Submetido ao periódico *Plos One*).

Lima-Garcia, J. F.; Motta EM; **Silva, Kathryn Ana**; Campos, M. M.; Calixto, J. B. The aspirin triggered-resolvin D series precursor 17(R)HDoHE and ATRvD1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. (Aceito para publicação no *British Journal of Pharmacology*).